



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

El efecto de la industria textil y el uso de plaguicidas en  
productores del Valle de Tehuacán, Puebla.

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

Dayron Didier Ramírez Gutiérrez

Asesora: Dra. Amparo Mauricio Gutiérrez

Codirector: Dr. Omar Romero Arenas

Febrero, 2025



## INDICE

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Antecedentes .....	4
Hipótesis .....	8
Objetivo General .....	9
Objetivos Específicos .....	10
Justificación .....	11
Materiales y Métodos .....	12
Sitio de muestreo .....	12
Selección de tamaño de muestra .....	13
Análisis estadísticos .....	14
Ensayo de citomas de micronúcleos bucales (BMCA) .....	14
Resultados .....	16
Parámetros sociodemográficos .....	16
Conteos de aberraciones cromosómicas .....	20
Discusión .....	27
Conclusión .....	30
Referencias .....	31
ANEXOS .....	35

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Respuestas obtenidas de la encuesta sociodemográfica y de actividades agrícolas, con el nivel de significancia de la diferencia entre grupos por categorías ....	16
Tabla 2. Plaguicidas utilizados por los productores de San Diego Chalma Tehuacán, Puebla .....	19
Tabla 3. Frecuencias de micronúcleos entre grupo de agricultores y grupo control, segmentados según las respuestas de las encuestas .....	23
Tabla 4. Células con aberraciones cromosómicas entre el grupo de agricultores y el grupo control de San Diego Chalma, Tehuacán .....	24

## **INDICE DE IMÁGENES**

Figura 1 Descripción del entorno y lugares de referencia del lugar de estudio .....	12
Figura 2. Gráfico de cajas y bigotes del número total de células con uno de los 6 tipos de daños citotóxicos por tratamiento .....	21
Figura 3. Histogramas de la distribución de células con aberraciones cromosómicas...	22
Figura 4 Células con cambios nucleares producto de daño citotóxico en el grupo agricultor.....	26

## RESUMEN

En Tehuacán, Puebla la economía está representada principalmente por el sector agrícola y se ve reflejado en la sociedad, cultura y economía de dicha región.

Con lo que respecta al sector salud, la población perteneciente a esta zona económica y se encuentra en un estado de vulnerabilidad debido a tres factores trascendentales: el uso excesivo de plaguicidas, malos hábitos y una mala gestión ambiental por parte de las empresas aledañas. En este estudio se consideraron los efectos de los plaguicidas expresados en daño citotóxico en un grupo de agricultores de la localidad de Tehuacán, México.

Aunado a la contaminación por exposición a plaguicidas en el sector agrícola y la población local, existe otro compuesto residual; el azul índigo, el cual podría aumentar el riesgo citotóxico. El azul índigo es de los colorantes textiles más utilizados por la industria de la mezclilla en Tehuacán, Puebla. En las descargas de aguas residuales, el índigo se oxida a isatín, compuesto fácilmente hidrolizable a ácido antranílico considerado tóxico para la vida acuática. Sin embargo, no se tienen registrados los riesgos a la exposición de contaminantes en esta localidad por lo que sería importante investigar los efectos de la toxicidad de estos compuestos. El objetivo de este estudio fue cuantificar aberraciones cromosómicas de tipo MNi (células micronucleadas), CC (cariorexis), KR (Cariorrexis), BN (células binucleadas), KL (cariólisis) y PY (picnosis) en agricultores expuestos a diversos contaminantes, para conocer el daño citotóxico por medio de ensayo de citomas de micronúcleos bucales (BMCA). La población dedicada a actividades agrícolas presentó las aberraciones cromosómicas como: células con micronúcleos (MNI), cromatina condensada (CC), Cariorrexis (KR), células binucleadas (BN), cariólisis (KL) y picnosis (PY). La población agrícola presentó mayor riesgo de daño citotóxico en las células micronucleadas, siendo 12 veces mayor que el grupo de referencia. La edad es un factor que influye en la presencia de células con micronúcleos, las personas de la tercera edad tienen un 30% más (0.28) con respecto a la población joven (0.19). Las muestras del citoma bucal recolectadas en la comunidad de San Diego Chalma, Tehuacán, Puebla, demostraron que el biomonitorio citotóxico es una herramienta útil y factible para estudiar la población expuesta a plaguicidas.

## 1. Introducción

En Tehuacán, Puebla la economía está representada principalmente por el sector agrícola (8.4% de la población), donde el cultivo del maíz generó un ingreso de 261 M de dólares anuales durante el año 2022 en ventas internacionales (1). Esto se ve reflejado en la sociedad, cultura y economía de dicha región.

Con lo que respecta al sector salud, tema central sobre el cual versa la presente investigación, la población perteneciente a esta zona económica podría encontrarse en un estado de vulnerabilidad debido a tres factores trascendentales: el uso excesivo de plaguicidas, malos hábitos y una mala gestión ambiental por parte de las empresas aledañas.

En este estudio se consideraron los efectos de los plaguicidas expresados en daño citotóxico en un grupo de agricultores de la localidad de Tehuacán, México. Se encuentra documentado que los plaguicidas tienen efectos negativos en la salud de la población y están directamente relacionados con las actividades agrícolas, particularmente en los países en desarrollo, además de representar una amenaza para la salud humana con más de 900 plaguicidas diferentes en el mercado, los cuales abarcan 2600 productos (2). La OMS (Organización Mundial de la Salud) clasifica los plaguicidas según su nivel de toxicidad, agrupándolos como: plaguicidas extremadamente peligrosos, plaguicidas altamente peligrosos, plaguicidas moderadamente peligrosos, plaguicidas levemente peligrosos y plaguicidas que es poco probable que presenten un peligro agudo (2,3).

En México, los esquemas tecnológicos de la revolución verde se impulsaron en la segunda mitad del siglo XX, incorporando prácticas convencionales, fertilizantes y plaguicidas en los sistemas de producción de maíz (4, 5). El consumo de plaguicidas por hectárea mostró un incremento desde 1940 hasta la última década del siglo XX. En este contexto, se estima la existencia de alrededor de 900 plaguicidas utilizados por los productores en el país, siendo los insecticidas químicos los más recurrentes para la producción de maíz, algodón, papa, chile, tomate, frijol, trigo, aguacate, café y tabaco en cantidades que oscilan entre 395 y 13.163 toneladas por año (6).

El potencial citotóxico es un factor de riesgo primario para los efectos que se presentan a largo plazo, como la toxicología cancerígena y reproductiva, así como las enfermedades

degenerativas (7). Las pruebas de citotoxicidad evalúan a nivel de ADN roturas de cadena simple y doble, mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas y formación de micronúcleos, entre otros (8).

Aunado a la contaminación por exposición a plaguicidas en el sector agrícola y la población local, existe otro compuesto residual: el azul índigo, el cual podría aumentar el riesgo citotóxico. El azul índigo es de los colorantes textiles más utilizados por la industria de la mezclilla en Tehuacán, Puebla. En las descargas de aguas residuales, el índigo se oxida a isatín, compuesto fácilmente hidrolizable a ácido antranílico considerado tóxico para la vida acuática (9). Sin embargo, no se tienen registrados los riesgos a la exposición de contaminantes en esta localidad por lo que sería importante investigar los efectos de la toxicidad de estos compuestos.

Una de las pruebas más utilizadas para evaluar la citotoxicidad es el ensayo de citomas de micronúcleos bucales (BMCA) utilizando linfocitos periféricos o células exfoliadas de la mucosa bucal (7). Uno de los marcadores de esta prueba son los micronúcleos, los cuales son fragmentos cromosómicos o cromosomas completos formados durante la anafase; estos fragmentos no pueden incluirse en los núcleos de las células hijas, sino que forman micronúcleos únicos o múltiples en el citoplasma (10). El BMCA de células bucales es útil como biomarcador del daño genético causado por hábitos de vida como el consumo de productos de tabaco y alcohol, deficiencias de micronutrientes, exposición a plaguicidas, así como defectos genéticos hereditarios (11).

La naturaleza no invasiva de esta técnica la convierte en una candidata atractiva para el biomonitoreo de poblaciones o individuos humanos (12). Por lo que el objetivo de este estudio es conocer el daño citotóxico por medio de BCMA en agricultores expuestos a plaguicidas y al colorante azul índigo.

## 2. Antecedentes

La industria consume el 10% del agua total extraída (7.3 km<sup>3</sup> anuales), la contaminación que genera en demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es equivalente a lo que producen 300 millones de habitantes. En 2002, las descargas industriales fueron de 170.6 m<sup>3</sup> /s. De los cuales la acuicultura presentó 67.6 m<sup>3</sup> /s (39.6%) de descargas de aguas residuales, seguida por la industria azucarera 45.9 m<sup>3</sup> /s (27%), la petrolera 11.4 m<sup>3</sup> /s (6.6%), los servicios 10.3 m<sup>3</sup> /s (6%) y la química 6.9 m<sup>3</sup> /s (4%) (13).

Por otro lado, el agua destinada para uso agropecuario constituye el 77% del total extraída (56 km<sup>3</sup>) (13)

El problema de la contaminación en México es grave, debido a que el 70% de los cuerpos de agua presentan contaminación, lo que ocasiona baja disponibilidad del agua principalmente en el norte y centro del país (14). Aunado a esto, de los 214.6 m<sup>3</sup>/s de agua residual generada por el sector industrial, solo se trata 70.5 m<sup>3</sup>/s (14).

Uno de los principales factores de contaminación acuífera es el uso indebido de los plaguicidas en el sector agrícola. La manipulación y aplicación de plaguicidas son un riesgo para el ser humano, ya sea como usuario o consumidor de vegetales, frutas y productos tratados (15).

En México, existe una lista de plaguicidas prohibidos y restringidos por su alto riesgo para la salud humana por su elevada persistencia y sus propiedades de bioacumulación.

Se ha demostrado que algunos plaguicidas tienen efectos citotóxicos *in vivo* de animales, es decir mutágenos categoría 2 y 3, por ejemplo; benomilo, carbendazim, DNOC (4,6-dinitro-o-cresol), bromuro de metilo, monocrotofos, fosfamidón) y otros considerados desprovistos de actividad citotóxica (15). Sin embargo, estudios posteriores encontraron distintos porcentajes de los siguientes plaguicidas en tejido adiposo de seres humanos, los cuales ya estaban prohibidos: 1) p,p'-DDE en 100% de las muestras con una media de 1.65 mg/kg; 2) p,p'-DDT en el 99.3 %, con una media de 0.23 mg/kg; 3) beta-HCH in 97.3 %, con una media de 0.063 mg/kg, y 4) o,p'-DDT en 93.3 %, con un media de 0.022 mg/kg. La tercera parte de la población de mayor edad (56 años para mujeres y 62 para hombres) registró los niveles más altos de contaminación (36).

Estos autores discuten la presencia del DDT en los plaguicidas comerciales, a pesar de que fue prohibido desde 1999, esto nos da indicios de su nula eliminación del mercado, y siguen siendo accesibles para la población en general. Desgraciadamente, en el país no se cuenta con una política nacional específica en materia de plaguicidas, ya que el plan nacional de desarrollo, que es la declaración de más alto nivel en México, no aborda la problemática específica de los plaguicidas. En cambio, incluye solamente objetivos, instrumentos políticos y regulatorios que abordan estas sustancias (21). Otra problemática importante por abordar es que no existe un monitoreo sistemático de la contaminación ambiental por químicos peligrosos, como lo es el plaguicida y sus efectos en la salud humana en el país (24). Esto es gracias a la falta de recursos para hacer estos monitoreos. Además, en México no se cuentan con valores de referencia o límites nacionales en el tema de contaminación del agua y el suelo por contaminación de plaguicidas.

Sin embargo, se han desarrollado diferentes estudios sobre ensayos del citoma de micronúcleos bucales como indicador de citotoxicidad en distintas comunidades del mundo y de México, utilizando las mismas técnicas de muestreo y de tinción. Rivera et al. (18) en Tlaxcala, México compararon dos grupos de productores agrícolas, uno con un mayor uso de herbicidas y plaguicidas con ingredientes activos tóxicos y el otro grupo, con hábitos más sustentables. Los agricultores que utilizaban con mayor regularidad herbicidas y plaguicidas presentaron daños citotóxicos significativos.

Otro estudio relevante con características similares a esta investigación es el de Ballestreri et al. (19) donde se examina el daño provocado por compuestos citotóxicos con la finalidad de prevenir y detectar factores de riesgo para la población por medio de biomonitoreos. En este estudio, se concluye que el uso de plaguicidas es uno de los mayores y más graves problemas de salud pública en las zonas rurales, y se recalca la validez de este tipo de investigaciones siendo muy eficaz a la hora de detectar de manera rápida y confiable cambios en el material genético en poblaciones expuestas a estos productos, el cual puede ser utilizado como indicador de mutagenicidad y como instrumento de seguimiento.

Otros factores que pueden afectar el incremento de estas aberraciones cromosómicas son la edad, ya que en diversos estudios se ha demostrado que cuando el humano se

encuentra en un estado avanzado de senescencia es más propenso a adquirir mutaciones sin posibilidad de corrección por parte de sus células, por ejemplo: los fibroblastos humanos normales podían entrar en un estado de detención irreversible del crecimiento (20). Estos autores también se plantearon la hipótesis de la existencia de factores celulares como los telómeros, cuya pérdida a través de divisiones celulares consecutivas limita la proliferación de las células normales. Continuaron especulando que este "cronómetro" podría estar detrás del proceso de envejecimiento del organismo.

Hoy en día, la senescencia celular se considera una respuesta al estrés desencadenada por una serie de "mecanismos de conteo", como el acortamiento de los telómeros, que se comprenden cada vez mejor a nivel molecular. En la actualidad se sabe que los telómeros consisten en elementos de ADN repetitivos al final de cromosomas lineales que protegen los extremos del ADN de la degradación y la recombinación (23). Debido a la incapacidad intrínseca de la maquinaria de replicación para copiar los extremos de las moléculas lineales, los telómeros se acortan progresivamente con cada ronda de división celular (22). Por ende, cuando la telomerasa alcanza una longitud críticamente corta se comporta como roturas de ADN de doble cadena que activan la proteína supresora de tumores p53, lo que resulta en senescencia o apoptosis iniciada por los telómeros (23). Otros hábitos muy influyentes como el tabaquismo y el alcoholismo son claves en el incremento de aberraciones cromosómicas, un claro ejemplo es el estudio de Upadhyay et al. (Micronuclei in Exfoliated Cells: A Biomarker of Genotoxicity in Tobacco Users) en donde se demostró que había una diferencia significativa en la citotoxicidad entre personas fumadoras y no fumadoras, dándonos como conclusión que los micronúcleos en las células mucosas exfoliadas de la mucosa bucal pueden usarse como biomarcador de citotoxicidad para predecir los efectos de los carcinógenos.

La técnica de tinción de Feulgen desde su introducción al ámbito científico ha sido una de las reacciones citohistoquímicas más relevantes en biología y medicina (17). Esta técnica ha servido para la localización y distribución cuantitativa del ADN tanto en células normales como anormales (17). Su reacción la cual consta de una hidrólisis acida en un entorno suave, lo cual hace que las bases de purina se desprendan del azúcar de oxirribosa, exponiendo los grupos aldehídos libres y dejando intacta la espina dorsal del ADN dejando una molécula "apurinica" (17). Tras el hidrolítico las células se exponen al reactivo de shift. Los sitios celulares con grupos aldehídos libres en la molécula de ADN apurinico se unen a la pararosalina blanqueada disuelta en el reactivo de shift

adquiriendo un color magenta. Este paso nos permite visualizar las moléculas de ADN que se encuentran en el núcleo teñidas de un color magenta y por ende teñiendo el núcleo en su totalidad.

### 3. Hipótesis:

Los agricultores de la zona de San Diego Chalma, Tehuacán, Puebla presentan mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas de tipo MNI (micronúcleos), CC (cromatina condensada), KR (cariorexis), BN (células binucleadas), KL (cariolisis), PY (picnosis) con respecto a personas que realizan prácticas agrícolas.

MNI: Los micronúcleos se obtienen por errores al momento de la división celular, al igual que todas las aberraciones cromosómicas y esto puede ser gracias a roturas cromosómicas, sustancias citotóxicas y radiación. Dando como resultado la pérdida cromosómica, lo cual causa que el reparto del material genético a la hora de la división celular no sea equitativo, dando como resultado el desprendimiento del material genético y que por lo tanto se excluya del núcleo en la célula hija originando un nuevo núcleo más pequeño denominado como micronúcleo, el cual es fácilmente detectable a través de un microscopio óptico. (25)

CC: Es una respuesta de lesión celular, que se distingue de la cariorexis por tener la membrana nuclear intacta.

KR: La membrana nuclear desaparece, dispersando la cromatina condensada en grupos

BN: Presencia de dos núcleos presentes en la célula producidos por la interferencia en la división celular.

KL: Membrana nuclear presente con la cromatina en disolución

PY: Núcleo encogido, en altos niveles es una respuesta a daño celular

H0: Mediana de agricultores  $\leq$  Mediana de referencia

HA: Mediana de agricultores  $>$  Mediana de referencia

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo General

El objetivo de este estudio es cuantificar aberraciones cromosómicas de tipo MNI, CC, KR, BN, KL y PY en agricultores expuestos a diversos contaminantes, para conocer el daño citotóxico por medio del ensayo de citomas de micronúcleos bucales (BMCA).

#### **4.2. Objetivos específicos**

1. Aplicar una entrevista a actores clave (productores) y grupo de referencia (no productores) sobre indicadores sociodemográficos en la zona de estudio.
2. Análisis de indicadores sociodemográficos (edad, sexo, lugar de nacimiento, tiempo residiendo en la zona de estudio, nivel de educación, ocupación, tabaquismo, alcoholismo y enfermedades e infecciones) en los grupos entrevistados.
3. Muestrear células epiteliales de la mucosa bucal de los individuos estudiados para la cuantificación de células con aberraciones cromosómicas.
4. Cuantificar las aberraciones cromosómicas de tipo micronúcleos (MNI), cromatina condensada (CC), Cariorexis (KR), células binucleadas (BN), Cariolisis (KL) y Picnosis (PY) a través de la tinción de Feulgen en los grupos estudiados.
5. Analizar los datos de las aberraciones cromosómicas de tipo micronúcleos (MNI), cromatina condensada (CC), Cariorexis (KR), células binucleadas (BN), Cariolisis (KL) y Picnosis (PY) para conocer el daño citotóxico en los grupos de productores y no productores.

## 5. Justificación

El maíz es el cultivo predominante de México, valorado como un producto básico de subsistencia y semi-subsistencia distribuido en la mitad de los municipios del país. El maíz comprende el 33% de la superficie cultivada del país con 7.5 millones de hectáreas (Ha) y aportó en 2023, el 18% del valor de producción del sector agrícola (\$72 mil millones de pesos) (31).

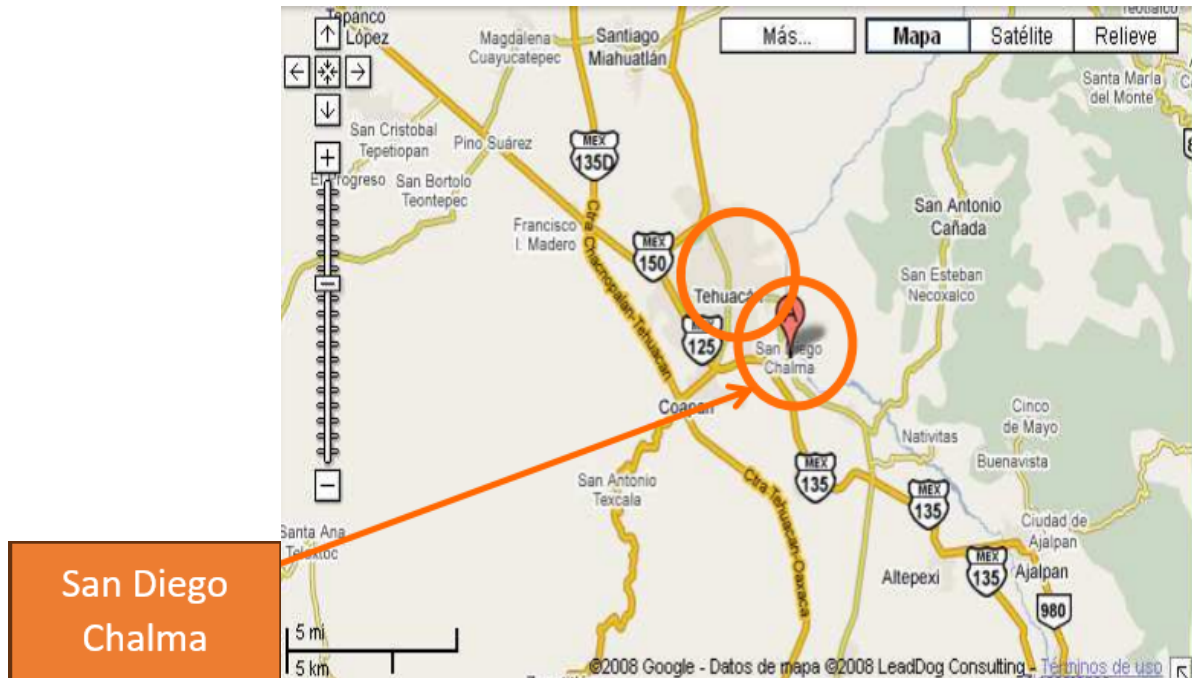
Esta gramínea es la más importante del estado de Puebla, y en el municipio de Tehuacán representa ~94% de la superficie total cultivada del estado, con un rendimiento de 5.67 Ton/Ha (31) con una superficie de siembra de 497,359 Ha, lo que resalta su importancia económica para este sector.

Además, presenta un modelo de producción agroindustrial dependiente de insumos externos, como agroquímicos y plaguicidas, el cual tiene implicaciones en la sustentabilidad (35). Por lo que el presente estudio tiene como objetivo monitorear a la población estudiada, así como los riesgos que causan los plaguicidas. Esto es importante debido a que la mayoría de la población de la zona estudiada realiza actividades agrícolas, donde los plaguicidas representan una amenaza para la salud de la población. Es importante generar información sobre el riesgo citotóxico que representan las prácticas agrícolas de la localidad de San Diego Chalma, Tehuacán, Puebla para prevenir y conocer las complicaciones del uso inadecuado de los plaguicidas que comprometen la salud de la población (25).

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1. Sitio de muestreo

El sitio de muestreo se encuentra localizado en la localidad de San Diego Chalma, Tehuacán se encuentra a 6 kilómetros al sureste del centro geográfico de Tehuacán, Puebla, 300 metros a la izquierda de la carretera pavimentada a su tramo Tehuacán -Altepeixi.



**Figura 1.** Descripción del entorno y lugares de referencia del lugar de estudio (San Diego Chalma, Tehuacán, Puebla).

La latitud (decimal) de San Diego Chalma es 18.437222 y la longitud en el sistema decimal es -97.361389. En el sistema DMS la latitud es 182614 y la longitud es -972141.

Este sitio pertenece a la cuenca del Papaloapan, zona con corrientes y sistemas de aguas subterráneas, por lo cual el agua es uno de sus principales recursos naturales y actualmente podría estar bajo amenaza de desaparición. El clima del sitio al ser semiárido vuelve indispensable la utilización de este recurso para el riego de los cultivos de la comunidad. Para principios de 1990 Tehuacán se posicionó entre los diez centros metropolitanos más contaminados del país, siendo la industria maquiladora un factor importante en la contaminación del agua (26).

De acuerdo con los datos más recientes del Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (2022), el municipio de Tehuacán generó un valor de la producción agrícola total de 273,765.22 pesos, dentro del cual se obtuvo un valor de 56,326.96MX de la producción de maíz representando el 20.57% del valor de la producción agrícola total. Un estudio realizado por Aparicio Soriano (2011) (30) determinó que la contaminación del agua en el valle de Tehuacán es inducida por las descargas residuales de la industria de lavanderías. A pesar de que el azul índigo se ha retirado de varias empresas, aún se pueden encontrar fábricas que continúan operando con lavanderías encargadas de lavar los teñidos de la mezcilla, ocupando miles de litros de agua y arrojándolos con químicos en vertederos improvisados a cielo abierto.

## **6.2. Selección de tamaño de muestra**

Los participantes considerados para la investigación son residentes de San Diego Chalma y la región adyacente, incluyendo Tehuacán, conformándose dos grupos. Por una parte, el conjunto de 15 agricultores que atendieron al cuestionario, y por las otras 20 personas sin relación a actividades agrícolas que conformaron el grupo control, del cual se censuraron 2 encuestas correspondientes a infantes, quedando un grupo control de 18 integrantes. En suma, el espacio muestral fue de 33 participantes, superior al tamaño de muestra mínima determinado según la fórmula de Santoyo [28] para la cual utilizamos un diseño de muestreo aleatorio simple, considerando un alfa bilateral ( $\alpha$ ) de 0.05, una distribución normal ( $z$ ) de 1.96 y un coeficiente de variabilidad (CV) de 0.8, dando  $N=28$  como cálculo la muestra ( $n$ ) considerando dos currículums o tratamientos respecto a la lista de locales agricultores y grupo muestra según la Ecuación (1):

$n = (NZ^2 \times \text{currículum}^2) / (((N - 1)d^2) + (Z^2 \times \text{currículum}^2))$  El tamaño de muestra fue determinado de acuerdo a dicha ecuación, para el posterior cálculo del tamaño del efecto.

## **6.3. Análisis estadísticos**

Se analizaron parámetros sociodemográficos como: edad, sexo, lugar de nacimiento, ocupación, nivel de educación, enfermedades infecciosas, hábitos de alcohol y tabaco, de los cuales se les realizó una prueba de chi cuadrada ( $X^2$ ) a un nivel de significancia de 0.05. Además, se investigó el tipo de plaguicidas que aplican los productores, dosis de aplicación, medidas de seguridad y tipo de cultivo. Posteriormente, se realizó un análisis

exploratorio de las frecuencias de aparición de seis distintas aberraciones cromosómicas: micronúcleos (MNI), cromatina condensada (CC), cariorexis (KR), binucleadas (BN), cariólisis (KL) y picnosis (PY). A las distribuciones de células con presencia de alguna aberración se les realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilkins con un alfa de 0.05. Al encontrar un número distinto de submuestra por grupo, se realizaron muestreos aleatorios simples para homogeneizar un criterio de  $n=15$  en cada tratamiento. Al mostrar distribuciones anormales en al menos uno de los grupos de cada una de las variables de respuesta se optó por la prueba U de Mann-Whitney también conocida como prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon para todas las variables numéricas referidas a las aberraciones cromosómicas enunciadas con una significancia del  $p<0.05$ .

Las encuestas fueron estudiadas mediante el cruce de las proporciones de respuesta a 40 ítems sociodemográficos y de prácticas agrícolas de distribución discreta correlacionándolos con los 6 tipos de aberraciones cromosómicas a través de Spearman ( $p<0.05$ ), con el objetivo de determinar si las prácticas agrícolas están influenciando en el número de células con daño citotóxico.

#### **6.4. Ensayo de citomas de micronúcleos bucales (BMCA)**

Se prepararon los reactivos necesarios para realizar la tinción de Feulgen. Los reactivos preparados fueron los siguientes:

- HCl 1N
- $C_2H_6O$  al 70%
- Reactivo de schiff

El reactivo se preparó vertiendo 200 ml de agua destilada hirviendo sobre 1 g de fucsina básica. Se agitó bien, se enfrió a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se filtró y se le agregó 30 ml de HCl 1 N al filtrado. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 1 g metabisulfito de potasio ( $K_2S_2O_5$ ). Se dejó reposar la solución toda la noche en la oscuridad o hasta que se desarrolle un color pajizo claro o rosa pálido.

- Ácido acético glacial 3:1

Procedimiento de Tinción Feulgen:

Se realizó la toma de muestras a personas voluntarias de acuerdo con la Declaración de Helsinki, donde se detalla que la presente investigación contempla el procedimiento ético de los métodos no invasivos de las personas seleccionadas. Se realizó un frotis

suavemente de la mucosa oral de ambas mejillas con espátulas de madera estériles, según el procedimiento descrito por Tolbert et al. (16).

Se obtuvo una muestra por cada persona, posteriormente se conservaron las muestras en 1 ml de solución salina (0.9 % NaCl) a 4 °C hasta su posterior análisis (17).

Por cada muestra se obtuvieron 10 laminillas y se realizó el procedimiento de tinción de Feulgen, el cual consiste en estriar la muestra en todo el portaobjetos para esparcirla. Se deja secar a temperatura ambiente por 10 min aprox. Posteriormente, se agregó el fijador (reactivo de shift) durante 15 min, dejamos secar y enjuagamos con etanol al 70% (C<sub>2</sub> H<sub>6</sub>O al 70%) y H<sub>2</sub>O destilada. Se secó la laminilla a temperatura ambiente (5 min aprox.). Aplicamos el agente hidrolizante (HCl 1N), y dejamos 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, aplicamos la Solución colorante 30 min o hasta que se torna púrpura y enjuagamos, dejamos que seque y procedemos a visualizar nuestras muestras (17).

Se utilizó el ensayo del citoma de micronúcleo bucal como indicador de citotoxicidad de anomalías nucleares presentes en agricultores de la región estudiada al azar.

## 7. Resultados

### 7.1. Parámetros sociodemográficos

La zona de estudio presentó un grupo de productores (18 individuos) y no productores (17 individuos). De los cuales el grupo de productores se encontró distribuido en los tres rangos de edad establecidos, mientras que el grupo de no productores estuvo representado para un rango de edad de 0-59 años.

**Tabla 1.** Respuestas obtenidas de la encuesta sociodemográfica y actividades agrícolas, con el nivel de significancia de la diferencia entre grupos por categorías.

Variables	Categoría	Grupo de agricultores A= 18		Grupo de no Agricultores		Valor de p
		Frecuencia %		NA= 17		
				Frecuencia %		
Edad	0 – 29 años	5	27.8	11	64.7	0.023*
	30 – 59 años	8	44.4	6	6	
	>60 años	5	27.8	0	0	
Sexo	Mujer	4	22.2	12	70.6	0.004**
	Hombres	14	77.8	5	29.4	
	Tehuacán	6	33.3	2	11.8	
Lugar de nacimiento	San Diego	11	61.1	5	29.4	0.008**
	Coapan	1	5.6	7	41.2	
	Otro	0	0	3	17.6	
	0-5 años	0	0	2	11.8	
Tiempo viviendo en la región	6-10 años	0	0	2	11.8	0.035*
	10-20 años	4	22.2	3	17.6	
	21-30 años	1	5.6	5	29.4	
	>30 años	13	72.2	5	29.4	
	Educación básica	13	72.2	6	35.3	
Nivel de educación	Educación media	2	11.1	3	17.6	0.179
	Educación media superior	2	11.1	3	17.6	
	Educación Técnica	0	0	3	17.6	
	Otra	1	5.6	2	11.8	
	Agricultor	18	0	0	0	
Ocupación	Empresario	0	0	10	51.8	0.001**
	Ama de casa	0	0	2	11.8	
	Estudiante	0	0	3	17.5	
	Menores	0	0	2	11.8	
Consumo de tabaco	Más de 6 cigarros a la semana	0	0	0	0	0.067
	1-5 cigarros a la semana	7	38.9	2	11.8	
	No fuma	11	61.1	15	88.2	
	De 2 a 3 veces por semana	1	5.6	1	5.6	
Consumo de alcohol	Una vez a la semana	11	61.1	5	29.4	0.158
	No toma	6	33.3	11	64.7	
Infecciones	Una vez al año	5	27.8	4	23.5	0.774
	Ninguna	13	72.2	13	76.5	

La variable de edad oscila en el grupo de productores entre 30 y 59 años principalmente; mientras que, en el grupo de no productores, fue una población más joven (0-29 años) siendo significativamente entre ellos ( $p=0.023$ ) (Tabla 1).

La variable de sexo tiene una de las significancias más importantes en el estudio, expresado en su valor de  $p$  ( $p=0.004$ ), debido a que la mayoría del grupo de agricultores son hombres al contrario del grupo control donde la mayoría de las personas son mujeres, esto puede ser explicado gracias a la dinámica social que se tiene presente en la zona estudiada, donde los hombres mayoritariamente hacen el trabajo de campo y las mujeres se dedican a las labores del hogar o al resto de las actividades ( $p=0.001$ ).

El grupo de agricultores el 70% de la población estudiada lleva viviendo en la zona de estudio (San Diego Chalma) por un periodo de más de 30 años; y el 30% de la población del grupo control lleva este mismo periodo de tiempo, siendo diferente significativamente ( $p=0.035$ ).

El nivel de educación de ambos grupos fue nivel básico, presentando un porcentaje alto los agricultores (70%), con respecto al grupo control (30%). Así, como también llegan a consumir tabaco el 40% de los agricultores (1-5 cigarrillos por semana), mientras que el grupo control solo consume el 11%. El 60% de la población agrícola consume alcohol una vez a la semana, mientras que en el grupo control solo el 30% consumen alcohol. Finalmente, ninguno de los 2 grupos presentó diferencias significativas ( $p=0.774$ ) para desarrollar enfermedades infecciosas.

**Tabla 2.** Plaguicidas utilizados por los productores de San Diego Chalma Tehuecan, Puebla.

Plaguicida	Ingrediente activo	Concentración	Uso agrícola	Mecanismo de acción tóxico	Nivel de toxicidad	Porcentaje de aplicación (N=18)
<b>Cialotrín</b>	Lambda-Cialotrína	2.5-5%	Insecticida para cultivos de cereales, frutas y vegetales	Afecta los canales de sodio en las células nerviosas	Alta (LD50 ~ 56 mg/kg)	27.27%
<b>Palgus</b>	Etoprofos	20%	Insecticida y nematocida para cultivos de maíz.	Inhibe la acetilcolinesterasa	Alta (LD50 ~ 9 mg/kg)	6.6%
<b>Spinetoram</b>	Spinetoram	25%	Insecticida para frutales y hortalizas.	Activa receptores nicotínicos de acetilcolina causando parálisis	Media (LD50 ~ 373 mg/kg)	15.17%
<b>Furadan (carbofuran)</b>	Carbofuran	35-40%	Insecticida para diversos cultivos	Inhibe la acetilcolinesterasa	Alta (LD50 ~ 8-14 mg/kg)	12.12%
<b>Lanate</b>	Metomilo	20-25%	Insecticida para frutales, hortalizas.	Inhibe la acetilcolinesterasa	Alta (LD50 ~ 17-34 mg/kg)	18.18%
<b>Clorpirifos (Foley)</b>	Clorpirifos	20-40%	Insecticida para cultivos de maíz y algodón.	Inhibe la acetilcolinesterasa	Alta (LD50 ~ 82-270 mg/kg)	21.2%

Fuente: (NORMA Oficial Mexicana NOM-Y-302-1988. Plaguicidas clasificación toxicológica. (1998, 1 junio). DOF – Diario Oficial de la Nación. Recuperado 11 de agosto de 2024, de [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4738135&fecha=01/06/1988](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4738135&fecha=01/06/1988)).

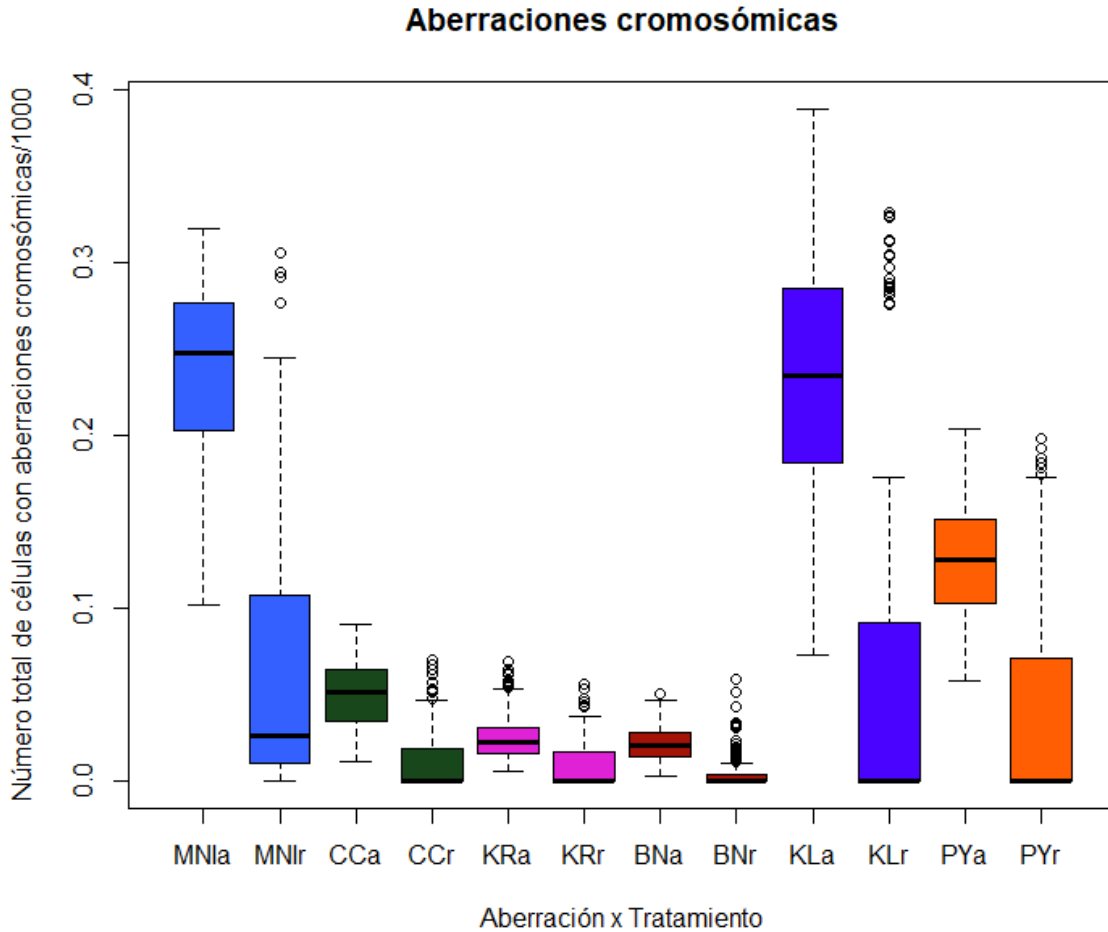
Los plaguicidas utilizados en la región de San Diego Chalma fueron: Cialotrín, Palgus, Spinetoram, Furadan, Lanate, Clorpirifos. Los insecticidas Cialotrín y Foley son aplicados con mayor frecuencia (>20%) por los productores de la región, para cultivos de maíz principalmente, desgraciadamente tienen un nivel de toxicidad alta expresada en (DL50) la cual es la dosis letal media, estimación estadística de la cantidad media necesaria para matar al 50 por ciento de una población representativa de una especie. Se expresa en miligramos de toxico por kilogramos de masa animal. Además, los productores no utilizan alguna medida de protección durante la aplicación de los plaguicidas y riegan con aguas residuales de la industria textil y por consiguiente están en contacto con dichos contaminantes.

### 7.1. Conteos de aberraciones cromosómicas

Durante el análisis descriptivo de los conteos celulares de cada aberración en los 33 frotis con 10 repeticiones por individuo, se transformaron los conteos en proporciones de células observadas cada 1000 conteos, se encontró que los conteos de células con aberraciones cromosómicas del grupo de agricultores fueron mayores que los del grupo

control. Generalmente el grupo de referencia presento conteos nulos, son datos anómalos representados como círculos en la Figura 2.

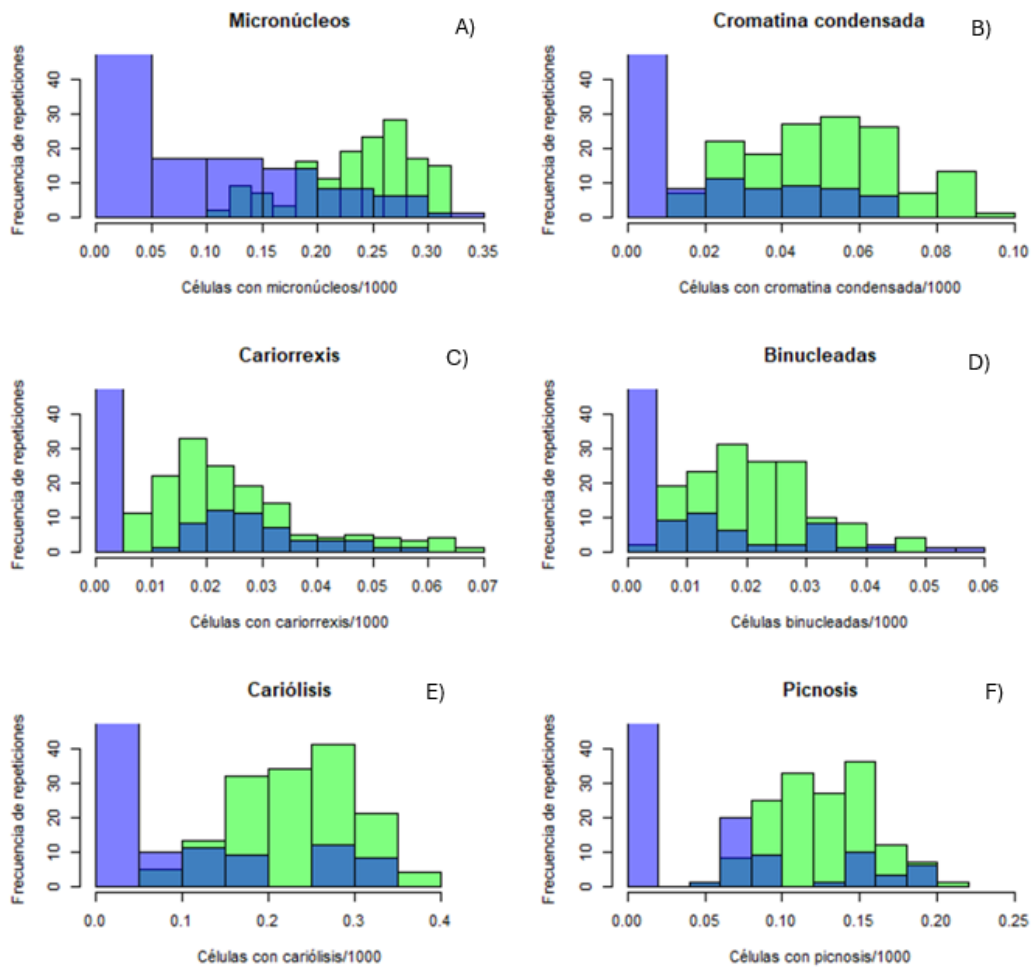
Se destacan 3 tipos de aberraciones cromosómicas, células micronucleadas (MNI), del tipo kariolisis (KR) y células picnóticas (PY).



**Figura 2.** Gráfico de cajas y bigotes del número total de células con uno de los 6 tipos de daños citotóxicos por tratamiento, siendo aquellos grupos terminados en “...a” los correspondientes a conteos de agricultores, y aquellos que finalizan en “...r” los del grupo de referencia o control.

En la figura 3 se observan las distribuciones de las observaciones de células con aberraciones cromosómicas de cada grupo, donde el color verde representa al grupo de agricultores, mientras que el azul representa al grupo de control. En el caso del grupo

control, la frecuencia total de células sin daño citotóxico fue tan alta que se ajustó la frecuencia a un máximo de 45 en el eje de las coordenadas. A medida que incrementan las células sanas hay una menor proporción de células con aberraciones cromosómicas. Para todos los casos, mientras que en el grupo de referencia se observa una asimetría negativa que evidencia una alta proporción de células sin daño citotóxico, la distribución de las proporciones de incidencia de todas las variables en el grupo de agricultores es más cercana a la normal con una mediana mayor. Las células micronucleadas y cariólisis (Figuras 3a y 3e) presentaron la mayor varianza encontrándose una mayor cantidad de células en el rango de 0.00-0.20 para el grupo de referencia; y para el grupo de agricultores en el rango de 0.20-0.40. Por otro lado, las células con picnosis (PY) (Figura 3f) en el grupo de referencia se encontraron en un rango de 0.05 – 0.15 y el grupo de agricultores de 0.1 a 0.2.



**Figura 3.** Histogramas de la distribución de células con aberraciones cromosómicas. En verde, se representan los datos obtenidos de agricultores, mientras que en azul se presentan los datos del grupo control.

Los números totales de micronúcleos (MNI) presentaron diferencias altamente significativas (valor de probabilidad  $<2.2e-16$ ) expresadas en casi todos los conteos obtenidos entre el grupo agricultor y el grupo de referencia. La edad está influenciando en el aumento de micronúcleos en ambos grupos, para agricultores mayores a 60 años presentaron mayor cantidad de células micronucleadas (275.82) mientras que el grupo de referencia en el rango de edad de 30 - 59 años solo alcanzaron una media de 102.7 micronúcleos (Tabla 3).

Los hombres que realizan actividades agrícolas presentaron mayor cantidad de células micronucleadas (250.6) y las mujeres (189.3) con respecto al grupo de referencia (Tabla 3)

El lugar de nacimiento, el consumo de tabaco y alcohol presentaron datos de micronúcleos alrededor de 200 en el grupo de agricultores, mientras que en el grupo de referencia se llegan a presentar células micronucleadas alrededor de 60. Por lo que las actividades agrícolas están repercutiendo en la presencia de células micronucleadas de la población (Tabla 3).

**Tabla 3.** Frecuencias de micronúcleos entre grupo de agricultores y grupo control, segmentados según las respuestas de las encuestas.

Variables	Respuestas	Agricultores		Referencia		MNI			
		Fa	Fr	Fa	Fr	$\bar{x}$ agricultor	$\bar{x}$ referencia	valor p	$\Phi$
Edad	0-29 años	5	15.15	9	27.27	194.64	17.82	< 2.2e-16	3.76
	30-59 años	5	15.15	9	27.27	243.18	102.76	< 2.2e-16	7.27
	>60 años	5	15.15	0	0.00	275.82			
Sexo	Masculino	12	36.36	5	15.15	250.07	100.9	< 2.2e-16	9.18
	Femenino	3	9.09	13	39.39	189.13	50.72	< 2.2e-16	5.16
Lugar de Origen	Ciudad de Tehuacán	5	15.15	3	9.09	235.82	59.2	< 2.2e-16	7.28
	San Diego Chalma	9	27.27	3	9.09	244.05	76.63	< 2.2e-16	8.78
	Coapan	0	0.00	8	24.24		52.97	< 2.2e-16	
	Otro	1	3.03	4	12.12	262	86.07	< 2.2e-16	4.39
Tabaco	No fuma	8	24.24	16	48.48	231.52	68.52	< 2.2e-16	8.35
	1-5 cigarrillos al día	7	21.21	2	6.06	245.14	39.65	< 2.2e-16	4.42
Alcohol	No toma	4	12.12	11	33.33	214.6	66.54	< 2.2e-16	7.67
	1 vez a la semana	10	30.30	6	18.18	243.96	63.52	< 2.2e-16	8.59
	2-3 veces a la semana	1	3.03	1	3.03	270.2	62.5	4.39E-05	1.90

**Tabla 4.** Células con aberraciones cromosómicas entre el grupo de agricultores y el grupo control de San Diego Chalma, Tehuacán.

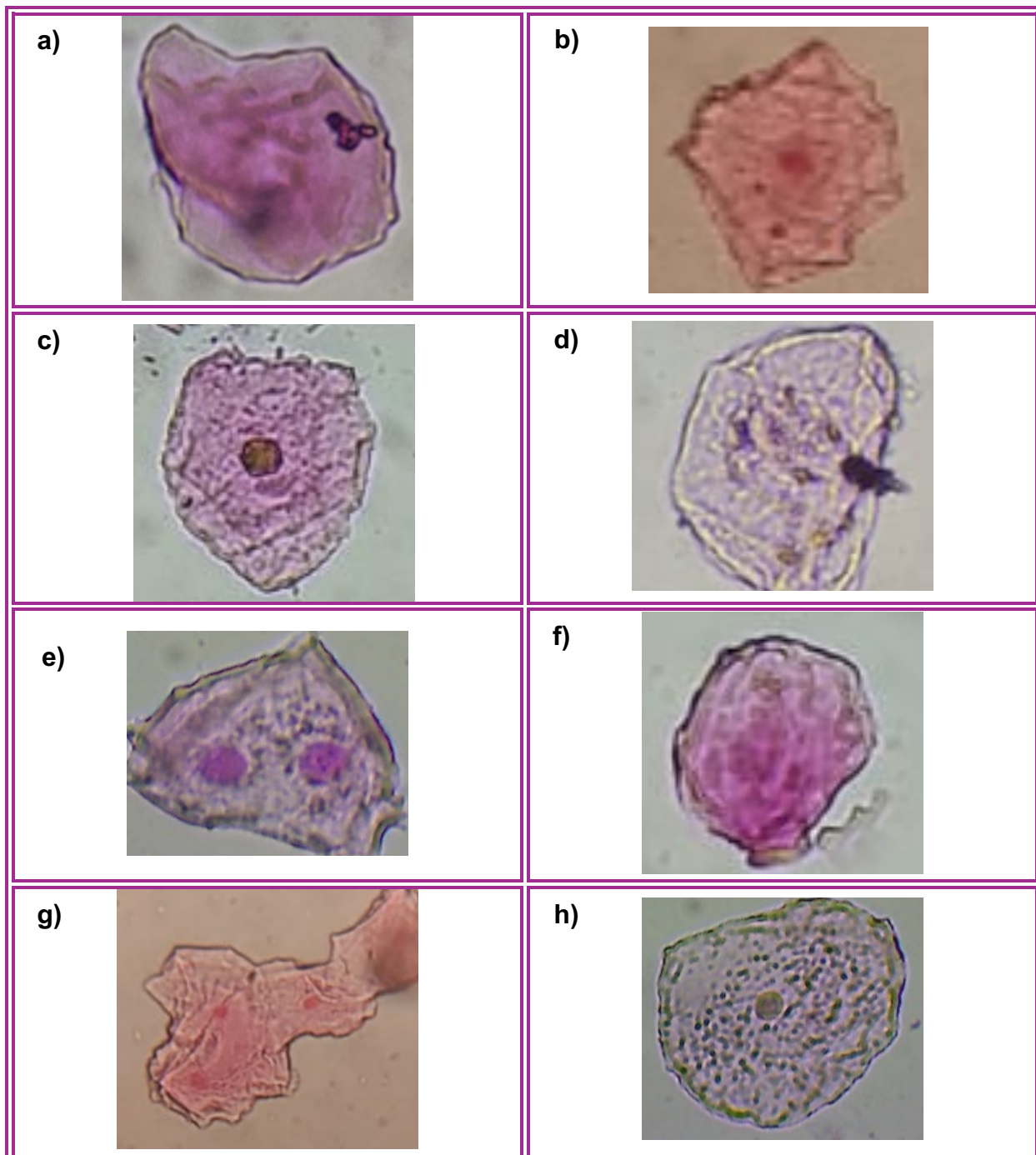
Variables	Mediana	IQR	d-Cohen	Valor de p- Willcox
MNI	GA=0.24	0.07	2.56	<2.2e-16***
	GC=0.02	0.09		
CC	GA=0.05	0.02	2.05	<2.2e-16***
	GC=0	0.02		
KR	GA=0.02	0.015	1.24	<2.2e-16***
	GC=0	0.018		
BN	GA=0.02	0.014	1.55	<2.2e-16***
	GC=0	0.00		
KL	GA=0.23	0.10	2.09	<2.2e-16***
	GC=0	0.08		
PY	GA=0.12	0.04	2.06	<2.2e-16***
	GC=0	0.06		

GA: Grupo de agricultores, GC: Grupo control, IQR: Rango intercuartílico, d de Cohen: tamaño del efecto de cada aberración cromosómica con un poder explicativo (1- $\beta$  error) de 0.95, una distribución normal (Z) de 1.96, un coeficiente de variabilidad (CV) de 0.8 y una tasa de asignación (N2/N1) de 1.2. Valor de p: p para la suma de rangos de Wilcoxon donde p<0.05 indica diferencias significativas entre grupos con \*\*\* simbolizando una significancia de 0.05, \*\*\*\* para 0.01 y \*\*\*\*\* para niveles de significancia de 0.001.

Se observaron las diferencias significativas del análisis de la prueba U de Mann-Whitney o de Suma de Rangos de Wilcoxon para todas las variables. Debido a la gran diferencia entre las medianas de los grupos, los MNI se consideraron una variable con mayor diferencia entre agricultores (0.24) y el grupo control (0.02); seguida de células con kariólisis (KL) para el grupo de agricultores con un valor de 0.23. Además, el grupo de agricultores presentó células del tipo KR (0.02), BN (0.02), PY (0.12) y CC (0.05).

En todos los casos, el tamaño del efecto es mayor a 0.8 considerándose dentro del rango de los efectos grandes de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney.

Los resultados obtenidos demostraron que una mayor exposición a pesticidas en el grupo de agricultores provocó cambios en la citocinesis y condujo a un mayor número de células con daño nuclear degenerativo relacionado con el daño citotóxico como se puede ver en la siguiente figura 4.



**Figura 4.** Células con aberraciones nucleares producto de daño citotóxico en el grupo agricultor. **a) y b)** Células con micronúcleos (Mni); **c)** Cromatina condensada (CC); **d)** Cariorrexis (KR); **e)** Células binucleadas (BN); **f)** Cariolisis (KL); **g)** Picnosis (PY); **h)** células normales.

## 8. Discusiones

Las encuestas mostraron cómo las variables socioambientales permiten contextualizar mejor los resultados de los conteos de aberraciones, así como la asociación entre variables externas a la metodología de los conteos que pueden tener inferencia en los daños citotóxico. Al tratarse de grupos con tamaños distintos (15 participantes agricultores y 18 en el grupo de referencia), el aporte a las frecuencias es distinto, con un 45.5% dotado por el grupo de agricultores y el 54.5% siendo aportado por el grupo control. Los contrastes de proporciones se indicaron a partir de las proporciones de micronúcleos.

Así, se observa que el 84.84% de los participantes tienen menos de 60 años, con únicamente 5 agricultores mayores a dicha edad. Ante ello, la tabla w permite contrastar cómo la media de mni para ambos grupos aumentó conforme aumenta la edad de los participantes, con 194.64 células con aberraciones en participantes menores a 30 años, 243.18 para aquellos entre 30 y 60 años y 275.82 en aquellas personas mayores a 60 años.

El espacio muestral está compuesto por 51.51% de hombres y 48.49% de mujeres, sin embargo, dentro de los grupos la equidad se encuentra sesgada, con una amplia mayoría de hombres agricultores (12 de 15) y una mayoría de mujeres en el grupo de referencia (13 de 18). En general, para todas las variables, la media masculina de los conteos de aberraciones supera a la media de las mujeres. Como ejemplo de ello, mientras que en los hombres hay un promedio de 250.07 aberraciones en el grupo de agricultores y 100.9 en el grupo de referencia, en las mujeres se contabilizó un promedio de 189.13 y 50.72 respectivamente.

Los participantes tienen como lugar de origen tres comunidades principales, siendo San Diego Chalma (36.36%) aquella con mayor cantidad de participantes, la mayoría de ellos agricultores; seguida de Coapan (24.24%) aportando únicamente personas para el grupo de referencia; por su parte, Tehuacán (24.24%) está representado por 5 agricultores y 3 participantes sin actividades agrícolas regulares. Para ninguna de las variables se observó una proporción diferenciada según el sitio, encontrando diferencias únicamente entre tratamientos.

Dentro de las variables externas que podrían estar causando ruido estadístico, se suele considerar la tendencia al alcoholismo y tabaquismo, en especial esta última al tratarse de un muestreo por ensayo de citomas de micronúcleos bucales. De acuerdo con lo contestado por los participantes, el 72.72% no fuma mientras que únicamente el 27.28% fuma de 1 a 5 cigarrillos al día, sin presencia de aquellos con un consumo mayor a 5 cigarrillos diarios. En cuanto al alcoholismo, el 45.45% de los encuestados no consumen alcohol, el 48.48% consume una vez por semana y 6.06% consume de 2 a 3 veces por semana. En ninguna de las variables, ni el tabaquismo ni el alcoholismo fueron factores diferenciadores del daño citotóxico.

De las seis aberraciones cromosómicas propuestas como indicadores, sólo las células con micronúcleos resultó ser un indicador con valores más altos de 0.24 y 0.02 células para el grupo de agricultores y el grupo de referencia respectivamente; considerando que el grupo de agricultores aplica plaguicidas como: Cialotrín, Palgus, Spinetoram, Furadan (carbofuran), Lanate y Clorpirifos (Foley), todos ellos se encuentran en las categorías de riesgo toxicológico medio y alto (DOF, 1998) (27). Al respecto, en el estudio de Rivera y col. (2022) reportaron proporciones de 0.408 células con micronúcleos en el grupo de productores con prácticas agrícolas convencionales y 0.253 para agricultores con prácticas agroecológicas. Mientras, en el presente estudio, la proporción de células con micronúcleos fue similar a los productores con prácticas agroecológicas, siendo 12 veces mayor la cantidad con células con micronúcleos comparadas con personas que no se dedican a actividades del campo.

Ante ello existe un menor daño citotóxico entre los agricultores de San Diego Chalma Tehuacán, Puebla y la población estudiada de Españita, Tlaxcala. Sin embargo, el espacio muestral de Rivera y col. (2022) (18) está compuesto por personas mayores a 46 años, con mayor consumo de tabaco (10 cigarrillos diarios) y alcohol (de 2 a 3 veces por semana y más de 4 veces por semana).

En ambos estudios no usan equipo de seguridad y protección para el riego, preparación y aplicación de plaguicidas, siendo un factor de riesgo destacado de acuerdo a Ferré y col. (2017) (32) en agricultores de fincas frutícolas, ellos reportan que el 65 % de los trabajadores han utilizado entre uno y tres elementos de protección personal, mientras

que en el caso de los agricultores encuestados por nuestro estudio, ninguno supera el uso de tres elementos de seguridad: botas, guantes y mascarilla.

Realizar el seguimiento de los distintos plaguicidas mencionados por los agricultores (Tabla 1) permitirá crear modelos de riesgo a la salud humana mediante el estudio toxicológico de la cantidad de residuos de plaguicidas presentes en suelo, aire, agua y biomasa (3). Para evaluar de acuerdo con la jurisdicción ambiental mexicana medidas de acción ante los plaguicidas más comúnmente usados y conseguir buenas prácticas agrícolas en el uso, manejo y confinamiento de plaguicidas.

De acuerdo con la encuesta, la escolaridad máxima de los agricultores suele ser básica a media. Esto concuerda con las proporciones observadas por el grupo de Rivera y col (18), lo que es necesario la capacitación y asesoría en el uso de plaguicidas para disminuir su vulnerabilidad a daños citotóxicos.

La exposición a pesticidas representa un problema significativo para la salud pública (33), afectando a trabajadores agrícolas desde el incremento del uso de plaguicidas en la Revolución Verde de finales del siglo XX (29). La falta de conocimiento y capacitación adecuada sobre el uso seguro de pesticidas ha permeado en las poblaciones donde el cultivo extensivo ha alterado los campos. Ante ello, los agricultores se han visto envueltos en dinámicas de prácticas ecológicas adversas para la salud ecosistémica y humana, cuyos riesgos aumentan a la par de los efectos adversos (34). Es crucial desarrollar y utilizar indicadores precisos para evaluar estos riesgos, lo que puede ayudar a implementar mejores prácticas de manejo y políticas de seguridad.

## 9. Conclusiones

Las muestras del citoma bucal recolectadas en la comunidad de San Diego Chalma, Tehuacán, Puebla, demostraron que el biomonitoreo citotóxico es una herramienta efectiva y viable para estudiar la población expuesta a plaguicidas.

La población dedicada a actividades agrícolas presento las aberraciones cromosómicas como: células con micronúcleos (MNI), cromatina condensada (CC), Cariorrexis (KR), células binucleadas (BN), cariólisis (KL) y picnosis (PY).

La población agrícola presentó significativamente mayor riesgo de daño citotóxico en las células micronucleadas, siendo 12 veces mayor que el grupo de referencia.

La edad es un factor que influye en la presencia de células con micronúcleos, las personas de la tercera edad tienen un 30% más (0.28) con respecto a la población más joven (0.19).

El sexo masculino se dedica principalmente a actividades agrícolas y es el grupo mayormente afectado teniendo un 24% (0.25) más de células micronucleadas (MNI) que las mujeres dedicadas al campo (0.19).

No se observó ninguna medida de protección cuando aplican plaguicidas como: Cialotrín, Palgus, Spinetoram, Furan (carbofuran), Lanate y Clorpirifos (Foley) estos plaguicidas están clasificados en su mayoría como altamente tóxicos por lo que es necesario asesorías y capacitación sobre medidas de seguridad, higiene y equipo de protección para el manejo de plaguicidas.

## Referencias

- 1.- Data México. (s. f.). Tehuacán: Economía, empleo, equidad, calidad de vida, educación, salud y seguridad pública | Data México. <https://www.economia.gob.mx/datamexico/es/profile/geo/tehuacan#economy>
- 2.- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402-1419.
- 3.- Li, Z., & Jennings, A. (2017). Worldwide regulations of standard values of pesticides for human health risk control: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7), 826.
- 4.- Harwood, J. (2019). Could the adverse consequences of the green revolution have been foreseen? How experts responded to unwelcome evidence. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 44(4), 509-535.
- 5.- Del-Val, E., Ramírez, E., & Astier, M. (2021). Comparison of arthropod communities between high and low input maize farms in Mexico. *CABI Agriculture and Bioscience*, 2(1).
- 6.- García-Gutiérrez, C., & Rodríguez-Meza, G. D. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8(3b), 1-10.
- 7.- Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P., & Marcos, R. (2010). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*, 26(1), 19-26.
- 8.- Reddy, M. V., Storer, R. D., Laws, G. M., Armstrong, M. J., Barnum, J. E., Gara, J. P., McKnight, C. G., Skopek, T. R., Sina, J. F., DeLuca, J. G., & Galloway, S. M. (2002). Genotoxicity of naturally occurring indole compounds: Correlation between covalent DNA binding and other genotoxicity tests. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40(1), 1-17.
- 9.- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2010). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-132.

- 10.- Costa, S., Costa, C., Madureira, J., Valdiglesias, V., Teixeira-Gomes, A., De Pinho, P. G., Laffon, B., & Teixeira, J. P. (2019). Occupational exposure to formaldehyde and early biomarkers of cancer risk, immunotoxicity and susceptibility. *Environmental Research*, 179, 108740.
- 11.- Podrimaj-Bytyqi, A., Borovečki, A., Selimi, Q., Manxhuka-Kerliu, S., Gashi, G., & Elezaj, I. R. (2018). The frequencies of micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds as biomarkers of genomic instability in patients with urothelial cell carcinoma. *Scientific Reports*, 8(1).
- 12.- Solís-Oba, M., Eloy-Juárez, M., Teutli, M., Nava, J. L., & González, I. (2009). Comparison of advanced techniques for the treatment of an indigo model solution: Electro incineration, chemical coagulation and enzymatic. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8(3), 275-282.
- 13.- Aqua Phoenix Scientific. (2017, marzo 11). Hoja de datos de seguridad. Recuperado 1 de noviembre de 2023, de [https://sds.aquaphoenixsci.com/SDS/171810\\_S25655\\_GHSUnitedStatesSDS\\_es\\_2017-11-03.pdf](https://sds.aquaphoenixsci.com/SDS/171810_S25655_GHSUnitedStatesSDS_es_2017-11-03.pdf)
- 14.- Fifonafe.gob.mx. (2005). San Diego Chalma, Tehuacán Puebla Tehuacán, Puebla. Recuperado 2 de noviembre de 2023, de <http://www.fifonafe.gob.mx/ventas/pdf/san%20diego%20chalma,%20tehuac%C3%A1n,%20puebla.pdf>
- 15.- Red de Acción de Plaguicidas (PAN). PAN International Lista Consolidada de Plaguicidas Prohibidos 4to. Disponible en línea: <http://paninternational.org/pan-international-consolidated-list-of-banned-pesticides/> (consultado el 20 de octubre de 2023).
- 16.- Podrimaj-Bytyqi, A., Borovečki, A., Selimi, Q., Manxhuka-Kerliu, S., Gashi, G., & Elezaj, I. R. (2018b). The frequencies of micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds as biomarkers of genomic instability in patients with urothelial cell carcinoma. *Scientific Reports*, 8(1).
- 17.- Chieco, P., & Derenzini, M. (1999). The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and Cell Biology*, 111(5), 345-358. <https://doi.org/10.1007/s004180050367>

- 18.- Rivera, A., Ramírez, L. C., Lezama, C. P., Simon, A. B., Garcia, B. L., & Romero-Arenas, O. (2022). Evaluation of cytotoxic and genotoxic risk derived from exposure to pesticides in corn producers in Tlaxcala, Mexico. *Applied Sciences*, 12(18), 9050.
- 19.- Ballestreri, E. (2017). Teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional a pesticidas: Revisão. *RevInter*, 10(1), 19–28.
- 20.- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R., & Battershill, J. M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: A review. *Mutagenesis*, 21(2), 93-103.
- 21.- Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP). (2019). Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024.
- 22.- Comisión Nacional de los Derechos Humanos (CNDH). (2018). Recomendación No. 82/2018. Ciudad de México.
- 23.- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). (2021). Gobernanza regulatoria en el sector de plaguicidas de México. OECD Publishing.
- 24.- Santoyo, H., Ramírez, P., & Suvedi, M. (2002). Manual para la evaluación de programas de desarrollo rural. Mundi-Prensa. Disponible en línea: <http://cistaam.edu.mx/libro/manual-la-evaluacion-programas-desarrollo-rural-2/> (consultado el 10 de diciembre de 2023).
- 25.- Li, Z., & Jennings, A. (2017). Worldwide regulations of standard values of pesticides for human health risk control: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7), 826.
- 26.- R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- 27.- Diario Oficial de la Federación (DOF). (1998, junio 1). Norma Oficial Mexicana NOM-Y-302-1998. Plaguicidas clasificación toxicológica. Recuperado 11 de agosto de 2024 de [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4738135&fecha=01/06/1988](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4738135&fecha=01/06/1988)
- 28.- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., & Bonassi, S. (1999). The Human MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1-2), 271-283.

- 29.- Molina, J. E. (2021). La revolución verde como revolución tecnocientífica: Artificialización de las prácticas agrícolas y sus implicaciones. *Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia*, 21(42), 175-204.
- 30.- Soriano, L. A. (s. f.). El impacto de maquiladoras textiles en el agua de San Francisco Altepexi, Puebla: Repercusiones en la vida comunitaria y posibles propuestas. En *Territorios indígenas, educación e interculturalidad en la región sureste de Puebla y sur de Veracruz* (p. 181).
- 31.- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2023). Avance de siembras y cosechas. Recuperado el 1 de agosto de 2024, de [https://nube.siap.gob.mx/avance\\_agricola/](https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/)
- 32.- Ferré, D. M., Quero, M., Hynes, V., Saldeña, E., Lentini, V., Tornello, M., ... & Gorla, N. B. (2018). Ensayo de micronúcleos de citoma bucal en trabajadores de fincas frutícolas que han aplicado plaguicidas alrededor de quince años. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 23-33.
- 33.- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5), 1402-1419.
- 34.- García-Gutiérrez, C., & Rodríguez-Meza, G. D. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8(3), 1-10. <https://bit.ly/3V8EjgC>
- 35.- Sánchez Morales, P. (2012). Evaluación de la sustentabilidad del agroecosistema maíz en la región de Huamantla, Tlaxcala.
- 36.-Pérez, M. A., Navarro, H., & Miranda, E. (2013). RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN HORTALIZAS: PROBLEMÁTICA Y RIESGO EN MÉXICO. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 29, 45-64.

## Anexo 1. Cuestionario sociodemográfico



### BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Centro de Agroecología-Instituto de Ciencias

El efecto de la industria textil y el uso de plaguicidas en productores del Valle de Tehuacán, Puebla.

<b>Datos generales.</b>			<b>N° de Encuesta:</b>		
<b>Edad:</b> (1) 0-29      (2) 30-59      (3) >60 años			<b>Sexo:</b> (1) M      (2) F		
<b>1. HISTORIAL CLINICO.</b>					
<b>Lugar de nacimiento:</b> (1) Cd. de Tehuacán (2) San Diego Chalma (3) San Pablo (4) Coapan (5) Otro		<b>Ocupación:</b> (1) Comercio (2) Agricultor (3) Labores del Hogar (4) Jubilado (5) Sin ocupación (< 3 años) (6) Estudia		<b>Nivel de educación:</b> (1) Sin educación (2) Educación básica (3) Educación media (4) Educación media superior (5) Educación técnica (6) Otra	
<b>2. PRESENCIA DE ENFERMEDADES CRONICAS DEGENERATIVAS</b>					
<b>(1) H/ A:</b> (1) SI (2) NO		<b>(2) Cirrosis hepática:</b> (1) SI (2) NO	<b>(3) Cáncer:</b> (1) SI (2) NO	<b>(4) Diabetes:</b> (1) SI (2) NO	<b>(5) Insuficiencia Renal:</b> (1)SI    (2)NO
<b>¿Padeció alguna enfermedad o infección en los últimos años?</b>  (1) SI (2) NO		<b>¿Hace que tiempo?</b> (1) <1 año (2) 1-2 años (3) >3 años	<b>¿Dónde?</b> (1) OJOS:                    (1) SI    (2)NO (2) OJOS:                    (1) SI    (2)NO (3) BOCA:                    (1) SI    (2)NO (4) PIEL:                      (1) SI    (2)NO (5) ESTOMACALES        (1) SI    (2)NO (6) RESPIRATORIA        (1) SI    (2)NO (7) OTRA                      (1) SI    (2)NO		
<b>3. HABITOS</b>					
<b>TABACO</b> (1) No fuma (2) 1-5 cigarrillos/día (3) 6-10 cigarrillos/ día (4) >10 cigarros / día			<b>ALCOHOL</b> (1) No consume (2) 1 vez a la sem. (3) 2-3 veces a la sem. (4) > 4 veces a la semana		
<b>¿Cuánto tiempo lleva viviendo en la región?</b> (1) 0 – 5 años (2) 6 – 10 años (3) 10 – 20 años (4) 21 – 30 años (5) > 30 años		<b>¿Cuánto tiempo lleva trabajando en actividades relacionadas a la agricultura?</b> (1) < 5 años (2) 5-10 años (3) 11-20 años (4) > 21 años		<b>¿Qué es lo que cultiva?</b> (1) Maíz (2) Hortalizas (3) perejil y cilantro (4) forraje verde (alfalfa) (5) Otro	<b>¿Cuál es su jornada de trabajo al día?</b> (1) < 4 h (2) 6-8 h (3) > 8 h

<b>Tipo agua utilizada en la agricultura:</b> (1) Temporal (2) Riego (3) Ambos	<b>Fuente de agua utilizada para riego:</b> (1) Agua de caudal (2) Pozo (3) Ambos	<b>Tiempo de riego utilizado (flujo del caudal)</b> (1) <3 h (2) 4-6 h (3) > 6 h	<b>¿Cuántas veces a la semana riega?</b> (1) 1 vez /semana (2) 2-3 veces /semana (3) 4-5 veces /semana (4) diariamente (5) nunca
<b>¿Utiliza algún tipo de protección personal para regar?</b> (1) Ninguno (2) Guantes (3) Mascarilla (4) Lentes de seguridad (5) Botas (6) Overol (7) Delantal (8) Máscara de cobertura completa (9) Otros _____	<b>¿Ha enfermado después de regar?</b> (1) SI (2) NO	<b>¿Qué padecimiento ha presentado?</b> (1) OJOS: (1) SI (2)NO (2) OIDOS: (1) SI (2)NO (3) BOCA: (1) SI (2)NO (4) PIEL: (1) SI (2)NO (5) ESTOMACALES (1) SI (2)NO (6) RESPIRATORIA (1) SI (2)NO (7) OTRA (1) SI (2)NO	
<b>¿Cuáles son las plagas más frecuentes en su cultivo?</b> (1) Maleza (2) Insectos (3) Patógenos (4) Roedores (5) Otro _____	<b>¿Qué plaguicidas utiliza?</b>  <b>¿Cuánto tiempo lleva usando los plaguicidas?</b> (1) < 5 años (2) 5-10 años (3) 11-20 años (4) > 21 años	<b>¿Utiliza más de un plaguicida a la vez?</b> (1) Si (2) No  <b>¿Qué dosis utiliza de plaguicida por hectárea?</b> (1) recomendada (2) personal	<b>¿Qué medida de seguridad utiliza para la preparación y/o aplicación de plaguicida?</b> (1) Ninguno (2) Guantes (3) Mascarilla (4) Lentes de seguridad (5) Botas (6) Overol (7) Delantal (8) Máscara de cobertura completa (9) Otros
<b>Si no utiliza todo el plaguicida ¿Qué hace con el sobrante?</b> (1) Vierte al suelo (2) Vierte al cauce (3) Desecha en contenedores especiales (4) Reutiliza y no desecha (5) Almacena en casa (6) Jardín (7) Otro _____	<b>¿Qué método utiliza para aplicar el plaguicida?</b> (1) No usa plaguicida (2) Espolvoreo (3) Pistola pulverizadora manual (4) Mochila pulverizadora (5) Fumigación aérea (6) Aplicación directa en el Suelo (7) Otro _____	<b>¿Cuántas veces aplica el plaguicida?</b> (1) 1 vez /mes (2) 1 vez /15 días (3) 1 vez /semana (4) 2-3 veces /semana (5) 4-5 veces /semana (6) diariamente (7) nunca  <b>¿Ha enfermado después de aplicar el plaguicida?</b> (1) SI (2) NO	<b>¿Qué padecimiento ha presentado?</b> (1) OJOS: (1) SI (2)NO (2) OIDOS: (1) SI (2)NO (3) BOCA: (1) SI (2)NO (4) PIEL: (1) SI (2)NO (5) ESTOMAGO (1) SI (2)NO (6) RESPIRATORIA (1) SI (2)NO (7) OTRA (1) SI (2)NO

**Anexo 2.** Representantes de la comunidad y nuestro equipo de trabajo del laboratorio de "Hongos y Patología Vegetal".



**Anexo 3. Toma de muestras y toma de datos sociodemográficos.**



Anexo 4. Evidencia de elaboración de reactivos, esterilización de materiales y elaboración de tinciones.



**Anexo 5.** Script usado para el presente estudio en el programa “R” con las pruebas estadísticas aplicadas.

Efectos genotípicos del uso de plaguicidas en agricultores del Valle de Tehuacán, Pue

```
#PAQUETES NECESARIAS#
```

```
install.packages("xlsx")
```

```
library("xlsx")
```

```
install.packages("skimr")
```

```
library(skimr)
```

```
install.packages("tidyverse")
```

```
library(tidyverse)
```

```
library(lubridate)
```

```
library(ggplot2)
```

```
install.packages("esquisser")
```

```
library(esquisser)
```

```
install.packages("janitor")
```

```
library(janitor)
```

```
library(readxl)
```

```
library(stats)
```

```
library(dplyr)
```

```
install.packages("reshape2")
```

```
library(reshape2)
```

```
#BASES DE DATOS#
```

```
#ENCUESTAS
```

```

setwd("C:/Users/reube/Desktop/plaguicidas y sus efectos genotóxicos")

dir()

encuestas<-read.xlsx("Efecto de los plaguicidas en productores del Valle de Tehuacán
Pue.xlsx", "Sheet1", encoding="UTF-8")

dim(encuestas)

class(encuestas)

summary(encuestas)

skim(encuestas)

muestra2<-encuestas%>%mutate_if(is.character,list(~na_if(.,"")))

skim(muestra2)

names(muestra2)

```

#### #O DESDE LA ENCUESTA DE MATRIZ NUMÉRICA

```

encuesta<-read.xlsx("Escala Efecto de los plaguicidas en productores del Valle de
Tehuacán Pue (1).xlsx", "Tratamientos",encoding="UTF-8")

dim(encuesta)

class(encuesta)

summary(encuesta)

skim(encuesta)

muestral2<-encuesta%>%mutate_if(is.character,list(~na_if(.,"")))

skim(muestral2)

names(muestral2)

muestral2$ID

```

```
cruce<-read.xlsx("cruce.xlsx", "Hoja1", encoding="UTF-8")
```

```
attach(cruce)
```

```
names(cruce)
```

```
#CONTEOS
```

```
setwd("C:/Users/reube/Desktop/plaguicidas y sus efectos genotóxicos")
```

```
dir()
```

```
conteos<-read.table("CONTEOS.txt", header=T)
```

```
attach(conteos)
```

```
names(conteos)
```

```
dim(conteos)
```

```
class(conteos)
```

```
summary(conteos)
```

```
skim(conteos)
```

```
#####
```

```
#SE HICIERON DOS GRUPOS BASANDONOS EN SU OCUPACIÓN, ASÍ COMO EL  
TIEMPO DEDICÁNDOSE A LABORES AGRÍCOLAS
```

```
#CONFORMANDO ASÍ UN GRUPO DE 15 AGRICULTORES (ENCUESTAS  
1,2,3,5,6,11,12,14,15,16,17,18,19,20,21
```

```
#Y UN GRUPO DE REFERENCIA SIN EXPERIENCIA EN ACTIVIDADES AGRÍCOLAS  
(ENCUESTAS 4,7,8,13,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32
```

```
#AGRICULTORES [c(1:30, 41:60, 101:120, 131:210), ]
```

```
#REFERENCIA [c(31:40, 61:80, 121:130, 211:320), ]
```

```
#CENSURANDO LAS ENCUESTAS DE INFANTES 9 Y 10 Y AGREGANDO AL GRUPO  
EXTERNO HACIENDO UNA MUESTRA DE 15:18
```

```
#GRUPO EXTERNO [c(321:350), ]
```

```
#####
```

```
#####Histogramas de las aberraciones cromosómicas contraste
```

```
#####
```

```
dev.new()
```

```
par(mfrow = c(3, 2))
```

```
hist(mnia*0.001, main="Micronúcleos",col=rgb(0,1,0,0.5), ylab="Frecuencia de  
repeticiones", xlab="Células con micronúcleos/1000",xlim=c(0,0.35),ylim=c(0,45))
```

```
hist(mnir*0.001, col=rgb(0,0,1,0.5), add=TRUE)
```

```
# labels<-c("Agricultores", "Grupo control")
```

```
# legend("topright", legend=labels,cex=0.5, inset=0.01,pch=15,  
col=c(rgb(0,1,0,0.5),rgb(0,0,1,0.5)))
```

```
hist(cca*0.001, main="Cromatina condensada",col=rgb(0,1,0,0.5), ylab="Frecuencia de  
repeticiones", xlab="Células con cromatina  
condensada/1000",xlim=c(0,0.1),ylim=c(0,45))
```

```
hist(ccr*0.001, col=rgb(0,0,1,0.5), add=TRUE)
```

```
# labels<-c("Agricultores", "Grupo control")
```

```
# legend("topright", legend=labels,cex=0.5, inset=0.01,pch=15,  
col=c(rgb(0,1,0,0.5),rgb(0,0,1,0.5)))
```

```
hist(kra*0.001, main="Cariorrexis",col=rgb(0,1,0,0.5), ylab="Frecuencia de repeticiones",  
xlab="Células con cariorrexis/1000",xlim=c(0,0.07),ylim=c(0,45))
```

```
hist(krr*0.001, col=rgb(0,0,1,0.5), add=TRUE)
```

```
# labels<-c("Agricultores", "Grupo control")
```

```
# legend("topright", legend=labels,cex=0.5, inset=0.01,pch=15,  
col=c(rgb(0,1,0,0.5),rgb(0,0,1,0.5)))
```

```
hist(bna*0.001, main="Binucleadas",col=rgb(0,1,0,0.5), ylab="Frecuencia de  
repeticiones", xlab="Células binucleadas/1000",xlim=c(0,0.065),ylim=c(0,45))
```

```
hist(bnr*0.001, col=rgb(0,0,1,0.5), add=TRUE)
```

```
hist(kla*0.001, main="Cariólisis",col=rgb(0,1,0,0.5), ylab="Frecuencia de repeticiones",  
xlab="Células con cariólisis/1000",xlim=c(0,0.45),ylim=c(0,45))
```

```
hist(klr*0.001, col=rgb(0,0,1,0.5), add=TRUE)
```

```
hist(pya*0.001, main="Picnosis",col=rgb(0,1,0,0.5), ylab="Frecuencia de repeticiones",  
xlab="Células con picnosis/1000",xlim=c(0,0.25),ylim=c(0,45))
```

```
hist(pyr*0.001, col=rgb(0,0,1,0.5), add=TRUE)
```

```
#####  
#####
```

```
#####Análisis exploratorio de las variables de respuesta#####
```

```
#####  
#####
```

```
mnia<-conteos[c(1:30, 41:60, 101:120, 131:210), 3]
```

```
mean(mnia*0.001)
```

```

sd(mnia*0.001)

var(mnia*0.001)

hist(mnia*0.001, main="Micronúcleos en trabajadores agrícolas", col="#3360FF",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de células con Micronúcleos/1000")

boxplot(mnia*0.001, main="Micronúcleos en trabajadores agrícolas", col="#3360FF",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de células con Micronúcleos/1000")

shapiro.test(mnia)#W = 0.95411, p-value = 7.306e-05 Se rechaza H0, no es normal

#DISTRIBUCION ANORMAL

dev.new()

par(mfrow = c(1, 2))

mnir<-conteos[c(31:40, 61:80, 121:130, 211:350), 3]

mean(mnir*0.001)

sd(mnir*0.001)

var(mnir*0.001)

hist(mnir*0.001, main="Micronúcleos en grupo de referencia", col="#3360FF",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de células con Micronúcleos/1000")

shapiro.test(mnir)

#Shapiro para n<50; se rechaza la H0, por lo tanto la variable no tiene distribución
normal

#DISTRIBUCIÓN ANORMAL

#####

cca<-conteos[c(1:30, 41:60, 101:120, 131:210), 4]

mean(cca*0.001) #0.04744

```

```

sd(cca*0.001) #0.01887159

var(cca*0.001) #0.0003561371

hist(cca*0.001, main="Cromatina Condensada en trabajadores agrícolas",
col="#18471C", ylab="Frecuencia", xlab="Número total de células con Cromatina
Condensada/1000")

shapiro.test(cca)#W = 0.98273, p-value = 0.05685 DISTRIBUCION NORMAL

dev.new()

par(mfrow = c(1, 2))

ccr<-conteos[c(31:40, 61:80, 121:130, 211:350), 4]

mean(ccr*0.001)

sd(ccr*0.001)

var(ccr*0.001)

hist(ccr*0.001, main="Cromatina Condensada en grupo de referencia", col="#18471C",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de células con Cromatina Condensada/1000")

shapiro.test(ccr) #DISTRIBUCION ANORMAL

#####

kra<-conteos[c(1:30, 41:60, 101:120, 131:210), 5]

mean(kra*0.001) #0.02658

sd(kra*0.001) # 0.01304509

var(kra*0.001) #0.0001701745

hist(kra*0.001, main="Cariorrexis en trabajadores agrícolas", col="#E022D7",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de células con Cariorrexis/1000")

shapiro.test(kra) #W = 0.90618, p-value = 3e-08 DISTRIBUCION ANORMAL

dev.new()

```

```

par(mfrow = c(1, 2))

krr<-conteos[c(31:40, 61:80, 121:130, 211:350), 5]

mean(krr*0.001) #0.0009354839

sd(krr*0.001) # 0.005208554

var(krr*0.001) #2.712903e-05

hist(krr*0.001, main="Cariorrexis en grupo de referencia", col="#E022D7",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de células con Cariorrexis/1000")

shapiro.test(krr) # DISTRIBUCION ANORMAL

#####

bna<-conteos[c(1:30, 41:60, 101:120, 131:210), 6]

mean(bna*0.001) #0.02075

sd(bna*0.001) # 0.01077814

var(bna*0.001) # 0.0001161683

hist(bna*0.001,main="Células Binucleadas en trabajadores agrícolas", col="#A31308",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de Células Binucleadas/1000")

shapiro.test(bna)#W = 0.9691, p-value = 0.00186 DISTRIBUCIÓN ANORMAL

dev.new()

par(mfrow = c(1, 2))

bnr<-conteos[c(31:40, 61:80, 121:130, 211:350), 6]

mean(bnr*0.001)

sd(bnr*0.001)

var(bnr*0.001)

hist(bnr*0.001,main="Células Binucleadas en grupo de referencia", col="#A31308",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de Células Binucleadas/1000")

```

```
shapiro.test(bnr)# DISTRIBUCIÓN ANORMAL
```

```
#####
```

```
kla<-conteos[c(1:30, 41:60, 101:120, 131:210), 7]
```

```
mean(kla*0.001)#0.222555
```

```
sd(kla*0.001) # 0.07688566
```

```
var(kla*0.001) #0.005911404
```

```
hist(kla, main="Cariólisis en trabajadores agrícolas", col="#4A03FF", ylab="Frecuencia",  
xlab="Número total de células con Cariólisis/1000")
```

```
shapiro.test(kla)#W = 0.98354, p-value = 0.07036 DISTRIBUCION NORMAL
```

```
dev.new()
```

```
par(mfrow = c(1, 2))
```

```
klr<-conteos[c(31:40, 61:80, 121:130, 211:350), 7]
```

```
mean(klr*0.001)#0.005096774
```

```
sd(klr*0.001) # 0.02837764
```

```
var(klr*0.001) #0.0008052903
```

```
hist(klr, main="Cariólisis en grupo de referencia", col="#4A03FF", ylab="Frecuencia",  
xlab="Número total de células con Cariólisis/1000")
```

```
shapiro.test(klr)# DISTRIBUCION ANORMAL
```

```
#####
```

```
pya<-conteos[c(1:30, 41:60, 101:120, 131:210), 8]
```

```
mean(pya*0.001) #0.123265
```

```

sd(pya*0.001) #0.03650573

var(pya*0.001) #0.001332668

hist(pya*0.001, main="Picnosis en trabajadores agrícolas", col="#FF5E03",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de células con Picnosis/1000")

shapiro.test(pya)#W = 0.98531, p-value = 0.1122 DISTRIBUCIÓN NORMAL

pyr<-conteos[c(31:40, 61:80, 121:130, 211:350), 8]

mean(pyr*0.001) #0.002935484

sd(pyr*0.001) #0.01634408

var(pyr*0.001) #0.000267129

hist(pyr*0.001, main="Picnosis en grupo de referencia", col="#FF5E03",
ylab="Frecuencia", xlab="Número total de células con Picnosis/1000")

shapiro.test(pyr)#W = 0.85739, p-value = 2.89e-07 DISTRIBUCION ANORMAL

```

```

#####
#####

```

```

#####PRUEBAS T DE STUDENT Y U DE MANN
WHITNEY#####

```

```

#####
#####

```

```
#SUPUIESTOS DE LA T DE STUDENT
```

```
#1. DOS MUESTRAS INDEPENDIENTES
```

```
#2. VARIANZAS IWALES (HOMOCEDASTICIDAD)
```

```
#PRUEBA FISHER var.test(muestra1, muestra 2)
```

```
#3. datos distribucion normal shapiro.test(var1)
```





```

var.test(bna, bnr) #SI HOMOCEASTICIDAD
wilcox.test(bna, bnr, alternative="two.sided", paired=F)

#SI HAY DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS
wilcox.test(bna, bnr, paired=F, mu=0, alternative="g", conf.level=0.95)
boxplot(bna, bnr, col="aquamarine")

#KL
var.test(kla, klr) #p-value =7.694e-09 POR TANTO NO HOMOCEASTICIDAD
wilcox.test(kla, klr, alternative="two.sided", paired=F)

#W = 9227, p-value = 1.808e-11 EXISTEN DIFERENCIAS PERO NO ES VALIDA LA
PRUEBA
wilcox.test(kla, klr, paired=F, mu=0, alternative="g", conf.level=0.95)
boxplot(kla, klr, col="green")

#PY
var.test(pya, pyr) #p-value =1.462e-13 NO HAY HOMOCEASTICIDAD
wilcox.test(pya, pyr, alternative="two.sided", paired=F)

#p-value = 1.994e-11 existen diferencias estadísticas pero no es valido
wilcox.test(pya, pyr, paired=F, mu=0, alternative="g", conf.level=0.95)
boxplot(pya, pyr, col="orange")

```

```

#####
#####Boxplot de todas las variables#####
#####

```

```
aberración<- c(rep("mni", 330) , rep("cc", 330) , rep("kr", 330), rep("bn", 330), rep("kl",  
330) , rep("py", 330))
```

```
mni_r<-sample(mnir*0.001,150, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
cc_r<-sample(ccr*0.001,150, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
kr_r<-sample(krr*0.001,150, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
bn_r<-sample(bnr*0.001,150, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
kl_r<-sample(klr*0.001,150, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
py_r<-sample(pyr*0.001,150, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
mni_a<-mnia*0.001
```

```
cc_a<-(cca*0.001)
```

```
kr_a<-(kra*0.001)
```

```
bn_a<-(bna*0.001)
```

```
kl_a<-(kla*0.001)
```

```
py_a<-(pya*0.001)
```

```
sample.aberración<-
```

```
data.frame(mni_a,mni_r,cc_a,cc_r,kr_a,kr_r,bn_a,bn_r,kl_a,kl_r,py_a,py_r)
```

```
aberración2<-
```

```
rename(sample.aberración,mnia=mni_a,cca=cc_a,kra=kr_a,bna=bn_a,kla=kl_a,pya=py_  
a mnir=mni_r,ccr=cc_r,krr=kr_r,bnr=bn_r,klr=kl_r,pyr=py_r)
```

```
boxplot(sample.aberración)
```

```
boxplot(aberración2,main="Aberraciones cromosómicas", ylab="Número total de células  
con aberraciones cromosómicas", xlab="Aberración x Tratamiento",
```

```
col=c("#3360FF", "#3360FF", "#18471C", "#18471C", "#E022D7", "#E022D7",  
"#A31308", "#A31308", "#4A03FF", "#4A03FF", "#FF5E03", "#FF5E03"))
```

```
#
```

```
#####  
#####
```

```
#####DATOS DESCRIPTIVOS DE LAS ENCUESTAS Y PRUEBAS DE JI ENTRE  
SUBGRUPOS#####
```

```
#####  
#####
```

```
#mni
```

```
edad1mniag<-conteos[c(111:120, 141:160, 191:210), 3]
```

```
edad1mnire<-conteos[c(39:40, 121:130, 241:260, 291:320, 331:350), 3]
```

```
edad2mniag<-conteos[c(41:60, 101:110, 131:140, 171:180), 3]
```

```
edad2mnire<-conteos[c(61:80, 211:240, 261:290, 321:330), 3]
```

```
edad3mniag<-conteos[c(1:30, 161:170, 181:190), 3]
```

```
mean(edad1mniag)
```

```
mean(edad1mnire)
```

```
mean(edad2mniag)
```

```
mean(edad2mnire)
```

```
mean(edad3mniag)
```

```
#X Mni edad
```

```
sampleedad1mnire<-sample(edad1mnire,50, replace = FALSE, prob = NULL)
```

```

edad1mn<-data.frame(edad1mniag,sampleedad1mnire)
xedad1mn<-chisq.test(edad1mn, correct=F);xedad1mn
phixedad1mn<-sqrt(xedad1mn$statistic/50); phixedad1mn

sampleedad2mnire<-sample(edad2mnire,50, replace = FALSE, prob = NULL)
edad2mn<-data.frame(edad2mniag,sampleedad2mnire)
xedad2mn<-chisq.test(edad2mn, correct=F);xedad2mn
phixedad2mn<-sqrt(xedad2mn$statistic/50); phixedad2mn

#CC
edad1ccag<-conteos[c(111:120, 141:160, 191:210), 4]
edad1ccre<-conteos[c(39:40, 121:130, 241:260, 291:320, 331:350), 4]
edad2ccag<-conteos[c(41:60, 101:110, 131:140, 171:180), 4]
edad2ccre<-conteos[c(61:80, 211:240, 261:290, 321:330), 4]
edad3ccag<-conteos[c(1:30, 161:170, 181:190), 4]

mean(edad1ccag)
mean(edad1ccre)
mean(edad2ccag)
mean(edad2ccre)
mean(edad3ccag)
mean(edad3ccre)

sampleedad1ccre<-sample(edad1ccre,50, replace=FALSE,prob=NULL)
edad1cc<-data.frame(edad1ccag,sampleedad1ccre)

```

```

xedad1cc<-chisq.test(edad1cc, correct=F)
phixedad1cc<-sqrt(xedad1cc$statistic/50)

sampleedad2ccre<-sample(edad2ccre,50, replace=FALSE,prob=NULL)
edad2cc<-data.frame(edad2ccag,sampleedad2ccre)
xedad2cc<-chisq.test(edad2cc, correct=F)
phixedad2cc<-sqrt(xedad2cc$statistic/50)

#KR
edad1krag<-conteos[c(111:120, 141:160, 191:210), 5]
edad1krre<-conteos[c(39:40, 121:130, 241:260, 291:320, 331:350), 5]
edad2krag<-conteos[c(41:60, 101:110, 131:140, 171:180), 5]
edad2krre<-conteos[c(61:80, 211:240, 261:290, 321:330), 5]
edad3krag<-conteos[c(1:30, 161:170, 181:190), 5]

mean(edad1krag)
mean(edad1krre)
mean(edad2krag)
mean(edad2krre)
mean(edad3krag)

sampleedad1krre<-sample(edad1krre,50, replace=FALSE,prob=NULL)
edad1kr<-data.frame(edad1krag,sampleedad1krre)
xedad1kr<-chisq.test(edad1kr, correct=F)
phixedad1kr<-sqrt(xedad1kr$statistic/50)

```

```
sampleedad2krre<-sample(edad2krre,50, replace=FALSE,prob=NULL)
edad2kr<-data.frame(edad2krag,sampleedad2krre)
xedad2kr<-chisq.test(edad2kr, correct=F)
phixedad2kr<-sqrt(xedad2kr$statistic/50)
```

#BN

```
edad1bnag<-conteos[c(111:120, 141:160, 191:210), 6]
edad1bnre<-conteos[c(39:40, 121:130, 241:260, 291:320, 331:350), 6]
edad2bnag<-conteos[c(41:60, 101:110, 131:140, 171:180), 6]
edad2bnre<-conteos[c(61:80, 211:240, 261:290, 321:330), 6]
edad3bnag<-conteos[c(1:30, 161:170, 181:190), 6]
mean(edad1bnag)
mean(edad1bnre)
mean(edad2bnag)
mean(edad2bnre)
mean(edad3bnag)
```

```
sampleedad1bnre<-sample(edad1bnre,50, replace=FALSE,prob=NULL)
edad1bn<-data.frame(edad1bnag,sampleedad1bnre)
xedad1bn<-chisq.test(edad1bn, correct=F)
phixedad1bn<-sqrt(xedad1bn$statistic/50)
```

```
sampleedad2bnre<-sample(edad2bnre,50, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```

edad2bn<-data.frame(edad2bnag,sampleedad2bnre)

xedad2bn<-chisq.test(edad2bn, correct=F)

phixedad2bn<-sqrt(xedad2bn$statistic/50)

#KL

edad1klag<-conteos[c(111:120, 141:160, 191:210), 7]

edad1klre<-conteos[c(39:40, 121:130, 241:260, 291:320, 331:350), 7]

edad2klag<-conteos[c(41:60, 101:110, 131:140, 171:180), 7]

edad2klre<-conteos[c(61:80, 211:240, 261:290, 321:330), 7]

edad3klag<-conteos[c(1:30, 161:170, 181:190), 7]

mean(edad1klag)

mean(edad1klre)

mean(edad2klag)

mean(edad2klre)

mean(edad3klag)

sampleedad1klre<-sample(edad1klre,50, replace=FALSE,prob=NULL)

edad1kl<-data.frame(edad1klag,sampleedad1klre)

xedad1kl<-chisq.test(edad1kl, correct=F)

phixedad1kl<-sqrt(xedad1kl$statistic/50)

sampleedad2klre<-sample(edad2klre,50, replace=FALSE,prob=NULL)

edad2kl<-data.frame(edad2klag,sampleedad2klre)

xedad2kl<-chisq.test(edad2kl, correct=F)

```

```
phixedad2kl<-sqrt(xedad2kl$statistic/50)
```

```
#PY
```

```
edad1pyag<-conteos[c(111:120, 141:160, 191:210), 8]
```

```
edad1pyre<-conteos[c(39:40, 121:130, 241:260, 291:320, 331:350), 8]
```

```
edad2pyag<-conteos[c(41:60, 101:110, 131:140, 171:180), 8]
```

```
edad2pyre<-conteos[c(61:80, 211:240, 261:290, 321:330), 8]
```

```
edad3pyag<-conteos[c(1:30, 161:170, 181:190), 8]
```

```
mean(edad1pyag)
```

```
mean(edad1pyre)
```

```
mean(edad2pyag)
```

```
mean(edad2pyre)
```

```
mean(edad3pyag)
```

```
sampleedad1pyre<-sample(edad1pyre,50, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
edad1py<-data.frame(edad1pyag,sampleedad1pyre)
```

```
xedad1py<-chisq.test(edad1py, correct=F)
```

```
phixedad1py<-sqrt(xedad1py$statistic/50)
```

```
sampleedad2pyre<-sample(edad2pyre,50, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
edad2py<-data.frame(edad2pyag,sampleedad2pyre)
```

```
xedad2py<-chisq.test(edad2py, correct=F)
```

```
phixedad2py<-sqrt(xedad2py$statistic/50)
```

```
#####SEXO#####33
```

```
#Mni
```

```
mascmniag<-conteos[c(11:30, 41:60, 131:210),3]
```

```
mascmnire<-conteos[c(121:130, 211:230, 271:280, 341:350),3]
```

```
fememniag<-conteos[c(1:10, 101:120),3]
```

```
fememnire<-conteos[c(31:40, 61:80, 231:270, 281:330),3]
```

```
mean(mascmniag)
```

```
mean(mascmnire)
```

```
mean(fememniag)
```

```
mean(fememnire)
```

```
samplemascmniag<-sample(mascmniag,50, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
mascmni<-data.frame(samplemascmniag,mascmnire)
```

```
xmascmni<-chisq.test(mascmni, correct=F)
```

```
phixmascmni<-sqrt(xmascmni$statistic/50)
```

```
samplefememnire<-sample(fememnire,30, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
fememni<-data.frame(samplefememnire,fememniag)
```

```
xfememni<-chisq.test(fememni, correct=F)
```

```
phixfememni<-sqrt(xfememni$statistic/50)
```

```
#CC
```

```
mascccag<-conteos[c(11:30, 41:60, 131:210),4]
```

```
mascccre<-conteos[c(121:130, 211:230, 271:280, 341:350),4]
```

```

femeccag<-conteos[c(1:10, 101:120),4]
femeccre<-conteos[c(31:40, 61:80, 231:270, 281:330),4]

mean(mascccag)
mean(mascccre)
mean(femeccag)
mean(femeccre)

samplemascccag<-sample(mascccag,50, replace=FALSE,prob=NULL)
masccc<-data.frame(samplemascccag,mascccre)
xmasccc<-chisq.test(masccc, correct=F)
phixmasccc<-sqrt(xmasccc$statistic/50)

samplefemeccre<-sample(femeccre,30, replace=FALSE,prob=NULL)
femecc<-data.frame(samplefemeccre,femeccag)
xfemecc<-chisq.test(femecc, correct=F)
phixfemecc<-sqrt(xfemecc$statistic/50)

#KR
masckrag<-conteos[c(11:30, 41:60, 131:210),5]
masckrre<-conteos[c(121:130, 211:230, 271:280, 341:350),5]
femekrag<-conteos[c(1:10, 101:120),5]
femekrre<-conteos[c(31:40, 61:80, 231:270, 281:330),5]
mean(masckrag)

```

```
mean(masckrre)
```

```
mean(femekrag)
```

```
mean(femekrre)
```

```
samplemasckrag<-sample(masckrag,50, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
masckr<-data.frame(samplemasckrag,masckrre)
```

```
xmasckr<-chisq.test(masckr, correct=F)
```

```
phixmasckr<-sqrt(xmasckr$statistic/50)
```

```
samplefemekrre<-sample(femekrre,30, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
femekr<-data.frame(samplefemekrre,femekrag)
```

```
xfemekr<-chisq.test(femekr, correct=F)
```

```
phixfemekr<-sqrt(xfemekr$statistic/50)
```

```
#BN
```

```
mascbnag<-conteos[c(11:30, 41:60, 131:210),6]
```

```
mascbnre<-conteos[c(121:130, 211:230, 271:280, 341:350),6]
```

```
femebnag<-conteos[c(1:10, 101:120),6]
```

```
femebnre<-conteos[c(31:40, 61:80, 231:270, 281:330),6]
```

```
mean(mascbnag)
```

```
mean(mascbnre)
```

```
mean(femebnag)
```

```
mean(femebnre)
```

```
samplemascbnag<-sample(mascbnag,50, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
mascbn<-data.frame(samplemascbnag,mascbnre)
```

```
xmascbn<-chisq.test(mascbn, correct=F)
```

```
phixmascbn<-sqrt(xmascbn$statistic/50)
```

```
samplefemebnre<-sample(femebnre,30, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
femebn<-data.frame(samplefemebnre,femebnag)
```

```
xfemebn<-chisq.test(femebn, correct=F)
```

```
phixfemebn<-sqrt(xfemebn$statistic/50)
```

```
#KL
```

```
mascklag<-conteos[c(11:30, 41:60, 131:210),7]
```

```
mascklre<-conteos[c(121:130, 211:230, 271:280, 341:350),7]
```

```
femeklag<-conteos[c(1:10, 101:120),7]
```

```
femeklre<-conteos[c(31:40, 61:80, 231:270, 281:330),7]
```

```
mean(mascklag)
```

```
mean(mascklre)
```

```
mean(femeklag)
```

```
mean(femeklre)
```

```
samplemascklag<-sample(mascklag,50, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
masckl<-data.frame(samplemascklag,mascklre)
```

```
xmasckl<-chisq.test(masckl, correct=F)
```

```
phixmasckl<-sqrt(xmasckl$statistic/50)
```

```
samplefemeklre<-sample(femeklre,30, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
femekl<-data.frame(samplefemeklre,femeklag)
```

```
xfemekl<-chisq.test(femekl, correct=F)
```

```
phixfemekl<-sqrt(xfemekl$statistic/50)
```

```
#PY
```

```
mascpyag<-conteos[c(11:30, 41:60, 131:210),8]
```

```
mascpyre<-conteos[c(121:130, 211:230, 271:280, 341:350),8]
```

```
femepyag<-conteos[c(1:10, 101:120),8]
```

```
femepyre<-conteos[c(31:40, 61:80, 231:270, 281:330),8]
```

```
mean(mascpyag)
```

```
mean(mascpyre)
```

```
mean(femepyag)
```

```
mean(femepyre)
```

```
samplemascpyag<-sample(mascpyag,50, replace=FALSE,prob=NULL)
```

```

mascpy<-data.frame(samplemascpyag,mascpyre)
xmascpy<-chisq.test(mascpy, correct=F)
phixmascpy<-sqrt(xmascpy$statistic/50)

samplefemepyre<-sample(femepyre,30, replace=FALSE,prob=NULL)
femepy<-data.frame(samplefemepyre,femepyag)
xfemepy<-chisq.test(femepy, correct=F)
phixfemepy<-sqrt(xfemepy$statistic/50)

#####LUGAR DE NACIMIENTO

#MNI
tehmniag<-conteos[c(41:50, 141:160,171:180, 191:200), 3]
tehmnire<-conteos[c(71:80,241:250,321:330), 3]
sdcmniag<-conteos[c(1:20, 51:60,101:120, 131:140, 161:170, 181:190), 3]
sdcmnire<-conteos[c(121:130, 221:230, 271:280), 3]
#coamniag<-conteos[c(1:1), 3]
coamnire<-conteos[c(211:220, 231:240, 251:270, 281:320), 3]
otrmniag<-conteos[c(21:30), 3]
otrmnire<-conteos[c(31:40, 61:70, 331:350), 3]
mean(tehmniag)
mean(tehmnire)
mean(sdcmniag)
mean(sdcmnire)

```

```
mean(coamniag)
```

```
mean(coamnire)
```

```
mean(otrmniag)
```

```
mean(otrmnire)
```

```
sampletehmniag<-sample(tehmniag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
tehmni<-data.frame(sampletehmniag,tehmnire)
```

```
xtehmni<-chisq.test(tehmni, correct=FALSE)
```

```
phixtehmni<-sqrt(xtehmni$statistic/30)
```

```
samplesdczniag<-sample(sdczniag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
sdczni<-data.frame(samplesdczniag,sdcznire)
```

```
xsdczni<-chisq.test(sdczni, correct=FALSE)
```

```
phixsdczni<-sqrt(xsdczni$statistic/30)
```

```
sampleotrmnire<-sample(otrmnire,10,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
otrmni<-data.frame(sampleotrmnire,otrmniag)
```

```
xotrmni<-chisq.test(otrmni, correct=FALSE)
```

```
phixotrmni<-sqrt(xotrmni$statistic/10)
```

```
#CC
```

```
tehccag<-conteos[c(41:50, 141:160,171:180, 191:200), 4]
```

```
tehccre<-conteos[c(71:80,241:250,321:330), 4]
```

```
sdcccag<-conteos[c(1:20, 51:60,101:120, 131:140, 161:170, 181:190), 4]
```

```

sdcccre<-conteos[c(121:130, 221:230, 271:280), 4]
#coaccag<-conteos[c(), 4]
coaccre<-conteos[c(211:220, 231:240, 251:270, 281:320), 4]
otrccag<-conteos[c(21:30), 4]
otrccre<-conteos[c(31:40, 61:70, 331:350), 4]
mean(tehccag)
mean(tehccre)
mean(sdcccag)
mean(sdcccre)
mean(coaccag)
mean(coaccre)
mean(otrccag)
mean(otrccre)

sampletehccag<-sample(tehccag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
tehcc<-data.frame(sampletehccag,tehccre)
xtehcc<-chisq.test(tehcc, correct=FALSE)
phixtehcc<-sqrt(xtehcc$statistic/30)

samplesdcccag<-sample(sdcccag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
sdccc<-data.frame(samplesdcccag,sdcccre)
xsdccc<-chisq.test(sdccc, correct=FALSE)
phixsdccc<-sqrt(xsdccc$statistic/30)

```

```

sampleotrccre<-sample(otrccre,10,replace=FALSE,prob=NULL)
otrcc<-data.frame(sampleotrccre,otrccag)
xotrcc<-chisq.test(otrcc, correct=FALSE)
phixotrcc<-sqrt(xotrcc$statistic/10)

#KR
tehkrage<-conteos[c(41:50, 141:160,171:180, 191:200), 5]
tehrre<-conteos[c(71:80,241:250,321:330), 5]
sdckrage<-conteos[c(1:20, 51:60,101:120, 131:140, 161:170, 181:190), 5]
sdckrre<-conteos[c(121:130, 221:230, 271:280), 5]
#coakrage<-conteos[c(), 5]
coakrre<-conteos[c(211:220, 231:240, 251:270, 281:320), 5]
otrkrage<-conteos[c(21:30), 5]
otrkrre<-conteos[c(31:40, 61:70, 331:350), 5]
mean(tehkrage)
mean(tehrre)
mean(sdckrage)
mean(sdckrre)
mean(coakrage)
mean(coakrre)
mean(otrkrage)
mean(otrkrre)

```

```

sampletehkrag<-sample(tehkrag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
tehkr<-data.frame(sampletehkrag,tehkrrre)
xtehkr<-chisq.test(tehkr, correct=FALSE)
phixtehkr<-sqrt(xtehkr$statistic/30)

samplesdckrag<-sample(sdckrag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
sdckr<-data.frame(samplesdckrag,sdckrre)
xsdckr<-chisq.test(sdckr, correct=FALSE)
phixsdckr<-sqrt(xsdckr$statistic/30)

sampleotrkrre<-sample(otrkrre,10,replace=FALSE,prob=NULL)
otrkr<-data.frame(sampleotrkrre,otrkr)
xotrkr<-chisq.test(otrkr, correct=FALSE)
phixotrkr<-sqrt(xotrkr$statistic/10)

#BN
tehbng<-conteos[c(41:50, 141:160,171:180, 191:200), 6]
tehbngre<-conteos[c(71:80,241:250,321:330), 6]
sdcbng<-conteos[c(1:20, 51:60,101:120, 131:140, 161:170, 181:190), 6]
sdcbngre<-conteos[c(121:130, 221:230, 271:280), 6]
#coabng<-conteos[c(), 6]
coabngre<-conteos[c(211:220, 231:240, 251:270, 281:320), 6]
otrbnng<-conteos[c(21:30), 6]
otrbnngre<-conteos[c(31:40, 61:70, 331:350), 6]

```

```
mean(tehbnag)
```

```
mean(tehbnre)
```

```
mean(sdcbnag)
```

```
mean(sdcbnre)
```

```
mean(coabnag)
```

```
mean(coabnre)
```

```
mean(otrbnag)
```

```
mean(otrbnre)
```

```
sampletehbnag<-sample(tehbnag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
tehbn<-data.frame(sampletehbnag,tehbnre)
```

```
xtehbn<-chisq.test(tehbn, correct=FALSE)
```

```
phixtehbn<-sqrt(xtehbn$statistic/30)
```

```
samplesdcbnag<-sample(sdcbnag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
sdcbn<-data.frame(samplesdcbnag,sdcbnre)
```

```
xsdcbn<-chisq.test(sdcbn, correct=FALSE)
```

```
phixsdcbn<-sqrt(xsdcbn$statistic/30)
```

```
sampleotrbnre<-sample(otrbnre,10,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
otrbn<-data.frame(sampleotrbnre,otrbnag)
```

```
xotrbn<-chisq.test(otrbn, correct=FALSE)
```

```
phioxotrbn<-sqrt(xotrbn$statistic/10)
```

```

#KL

tehklag<-conteos[c(41:50, 141:160,171:180, 191:200), 7]

tehkire<-conteos[c(71:80,241:250,321:330), 7]

sdcklag<-conteos[c(1:20, 51:60,101:120, 131:140, 161:170, 181:190), 7]

sdckire<-conteos[c(121:130, 221:230, 271:280), 7]

#coaag<-conteos[c(), 7]

coakire<-conteos[c(211:220, 231:240, 251:270, 281:320), 7]

otrklag<-conteos[c(21:30), 7]

otrklire<-conteos[c(31:40, 61:70, 331:350), 7]

mean(tehklag)

mean(tehkire)

mean(sdcklag)

mean(sdckire)

mean(coakire)

mean(otrklag)

mean(otrklire)

sampletehklag<-sample(tehklag,30,replace=FALSE,prob=NULL)

tehkl<-data.frame(sampletehklag,tehkire)

xtehkl<-chisq.test(tehkl, correct=FALSE)

phixtehkl<-sqrt(xtehkl$statistic/30)

```

```
samplesdcklag<-sample(sdcklag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
sdckl<-data.frame(samplesdcklag,sdcklre)
```

```
xsdckl<-chisq.test(sdckl, correct=FALSE)
```

```
phixsdckl<-sqrt(xsdckl$statistic/30)
```

```
sampleotrklre<-sample(otrklre,10,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
otrkl<-data.frame(sampleotrklre,otrklag)
```

```
xotrkl<-chisq.test(otrkl, correct=FALSE)
```

```
phixotrkl<-sqrt(xotrkl$statistic/10)
```

```
#PY
```

```
tehpyag<-conteos[c(41:50, 141:160,171:180, 191:200), 8]
```

```
tehpyre<-conteos[c(71:80,241:250,321:330), 8]
```

```
sdcpyag<-conteos[c(1:20, 51:60,101:120, 131:140, 161:170, 181:190), 8]
```

```
sdcpyre<-conteos[c(121:130, 221:230, 271:280), 8]
```

```
#coaag<-conteos[c(), 8]
```

```
coapyre<-conteos[c(211:220, 231:240, 251:270, 281:320), 8]
```

```
otrpyag<-conteos[c(21:30), 8]
```

```
otrpyre<-conteos[c(31:40, 61:70, 331:350), 8]
```

```
mean(tehpyag)
```

```
mean(tehpyre)
```

```
mean(sdcpyag)
```

```
mean(sdcpyre)
```

```
mean(coapyre)
```

```
mean(otrpyag)
```

```
mean(otrpyre)
```

```
sampletehpyag<-sample(tehpyag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
tehpy<-data.frame(sampletehpyag,tehpyre)
```

```
xtehpy<-chisq.test(tehpy, correct=FALSE)
```

```
phixtehpy<-sqrt(xtehpy$statistic/30)
```

```
samplesdcpyag<-sample(sdcpyag,30,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
sdcpy<-data.frame(samplesdcpyag,sdcpyre)
```

```
xsdcpy<-chisq.test(sdcpy, correct=FALSE)
```

```
phixsdcpy<-sqrt(xsdcpy$statistic/30)
```

```
sampleotrpyre<-sample(otrpyre,10,replace=FALSE,prob=NULL)
```

```
otrpy<-data.frame(sampleotrpyre,otrpyag)
```

```
xotrpy<-chisq.test(otrpy, correct=FALSE)
```

```
phixotrpy<-sqrt(xotrpy$statistic/10)
```

```
#####TABACO
```

```
#MNI
```

```

fum0mniag<-conteos[c(1:30, 41:50, 101:120,151:170), 3]
fum0mnire<-conteos[c(31:40,61:80, 121:130, 211:250, 261:330, 341:350), 3]
fum1mniag<-conteos[c(51:60, 131:150, 171:210), 3]
fum1mnire<-conteos[c(251:260,331:340), 3]

mean(fum0mniag)
mean(fum0mnire)
mean(fum1mniag)
mean(fum1mnire)

samplefum0mnire<-sample(fum0mnire,80, replace=FALSE, prob=NULL)
fum0mni<-data.frame(samplefum0mnire,fum0mniag )
xfum0mni<-chisq.test(fum0mni, correct=FALSE)
phixfum0mni<-sqrt(xfum0mni$statistic/80)

samplefum1mniag<-sample(fum1mniag,20, replace=FALSE, prob=NULL)
fum1mni<-data.frame(samplefum1mniag,fum1mnire)
xfum1mni<-chisq.test(fum1mni, correct=FALSE)
phixfum1mni<-sqrt(xfum1mni$statistic/20)

#CC
fum0ccag<-conteos[c(1:30, 41:50, 101:120,151:170), 4]
fum0ccre<-conteos[c(31:40,61:80, 121:130, 211:250, 261:330, 341:350), 4]
fum1ccag<-conteos[c(51:60, 131:150, 171:210), 4]

```

```

fum1ccre<-conteos[c(251:260,331:340), 4]

mean(fum0ccag)

mean(fum0ccre)

mean(fum1ccag)

mean(fum1ccre)

samplefum0ccre<-sample(fum0ccre,80, replace=FALSE, prob=NULL)

fum0cc<-data.frame(samplefum0ccre,fum0ccag )

xfum0cc<-chisq.test(fum0cc, correct=FALSE)

phixfum0cc<-sqrt(xfum0cc$statistic/80)

samplefum1ccag<-sample(fum1ccag,20, replace=FALSE, prob=NULL)

fum1cc<-data.frame(samplefum1ccag,fum1ccre)

xfum1cc<-chisq.test(fum1cc, correct=FALSE)

phixfum1cc<-sqrt(xfum1cc$statistic/20)

#KR

fum0krag<-conteos[c(1:30, 41:50, 101:120,151:170), 5]

fum0krre<-conteos[c(31:40,61:80, 121:130, 211:250, 261:330, 341:350), 5]

fum1krag<-conteos[c(51:60, 131:150, 171:210), 5]

fum1krre<-conteos[c(251:260,331:340), 5]

mean(fum0krag)

mean(fum0krre)

```

```
mean(fum1krag)
```

```
mean(fum1krre)
```

```
samplefum0krre<-sample(fum0krre,80, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
fum0kr<-data.frame(samplefum0krre,fum0krag )
```

```
xfum0kr<-chisq.test(fum0kr, correct=FALSE)
```

```
phixfum0kr<-sqrt(xfum0kr$statistic/80)
```

```
samplefum1krag<-sample(fum1krag,20, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
fum1kr<-data.frame(samplefum1krag,fum1krre)
```

```
xfum1kr<-chisq.test(fum1kr, correct=FALSE)
```

```
phixfum1kr<-sqrt(xfum1kr$statistic/20)
```

```
#BN
```

```
fum0bnag<-conteos[c(1:30, 41:50, 101:120,151:170), 6]
```

```
fum0bnre<-conteos[c(31:40,61:80, 121:130, 211:250, 261:330, 341:350), 6]
```

```
fum1bnag<-conteos[c(51:60, 131:150, 171:210), 6]
```

```
fum1bnre<-conteos[c(251:260,331:340), 6]
```

```
mean(fum0bnag)
```

```
mean(fum0bnre)
```

```
mean(fum1bnag)
```

```
mean(fum1bnre)
```

```
samplefum0bnre<-sample(fum0bnre,80, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
fum0bn<-data.frame(samplefum0bnre,fum0bnag)
```

```
xfum0bn<-chisq.test(fum0bn, correct=FALSE)
```

```
phixfum0bn<-sqrt(xfum0bn$statistic/80)
```

```
samplefum1bnag<-sample(fum1bnag,20, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
fum1bn<-data.frame(samplefum1bnag,fum1bnre)
```

```
xfum1bn<-chisq.test(fum1bn, correct=FALSE)
```

```
phixfum1bn<-sqrt(xfum1bn$statistic/20)
```

```
#KL
```

```
fum0klag<-conteos[c(1:30, 41:50, 101:120,151:170), 7]
```

```
fum0klre<-conteos[c(31:40,61:80, 121:130, 211:250, 261:330, 341:350), 7]
```

```
fum1klag<-conteos[c(51:60, 131:150, 171:210), 7]
```

```
fum1klre<-conteos[c(251:260,331:340), 7]
```

```
mean(fum0klag)
```

```
mean(fum0klre)
```

```
mean(fum1klag)
```

```
mean(fum1klre)
```

```
samplefum0klre<-sample(fum0klre,80, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
fum0kl<-data.frame(samplefum0klre,fum0klag)
```

```
xfum0kl<-chisq.test(fum0kl, correct=FALSE)
```

```
phixfum0kl<-sqrt(xfum0kl$statistic/80)
```

```
samplefum1klag<-sample(fum1klag,20, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
fum1kl<-data.frame(samplefum1klag,fum1klre)
```

```
xfum1kl<-chisq.test(fum1kl, correct=FALSE)
```

```
phixfum1kl<-sqrt(xfum1kl$statistic/20)
```

```
#PY
```

```
fum0pyag<-conteos[c(1:30, 41:50, 101:120,151:170), 8]
```

```
fum0pyre<-conteos[c(31:40,61:80, 121:130, 211:250, 261:330, 341:350), 8]
```

```
fum1pyag<-conteos[c(51:60, 131:150, 171:210), 8]
```

```
fum1pyre<-conteos[c(251:260,331:340), 8]
```

```
mean(fum0pyag)
```

```
mean(fum0pyre)
```

```
mean(fum1pyag)
```

```
mean(fum1pyre)
```

```
samplefum0pyre<-sample(fum0pyre,80, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
fum0py<-data.frame(samplefum0pyre,fum0pyag)
```

```
xfum0py<-chisq.test(fum0py, correct=FALSE)
```

```
phixfum0py<-sqrt(xfum0py$statistic/80)
```

```
samplefum1pyag<-sample(fum1pyag,20, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
fum1py<-data.frame(samplefum1pyag,fum1pyre)
```

```

xfum1py<-chisq.test(fum1py, correct=FALSE)
phixfum1py<-sqrt(xfum1py$statistic/20)

#####ALCOHOL

#MNI
toma0mniag<-conteos[c(21:30,101:120,181:190), 3]
toma0mnire<-conteos[c(31:40,61:80,121:130,221:250,271:280,301:320,341:350), 3]
toma1mniag<-conteos[c(1:20,41:60,131:170,191:210), 3]
toma1mnire<-conteos[c(211:220,251:270,281:300,321:330), 3]
toma2mniag<-conteos[c(171:180), 3]
toma2mnire<-conteos[c(331:340), 3]
mean(toma0mniag)
mean(toma0mnire)
mean(toma1mniag)
mean(toma1mnire)
mean(toma2mniag)
mean(toma2mnire)

sampletoma0mnire<-sample(toma0mnire,40, replace=FALSE, prob=NULL)
toma0mni<-data.frame(sampletoma0mnire,toma0mniag)
xtoma0mni<-chisq.test(toma0mni, correct=FALSE)
phixtoma0mni<-sqrt(xtoma0mni$statistic/40)

sampletoma1mniag<-sample(toma1mniag,60, replace=FALSE, prob=NULL)

```

```
toma1mni<-data.frame(sampletoma1mniag,toma1mnire)
```

```
xtoma1mni<-chisq.test(toma1mni, correct=FALSE)
```

```
phixtoma1mni<-sqrt(xtoma1mni$statistic/60)
```

```
toma2mni<-data.frame(toma2mnire,toma2mniag)
```

```
xtoma2mni<-chisq.test(toma2mni, correct=FALSE)
```

```
phixtoma2mni<-sqrt(xtoma2mni$statistic/10)
```

```
#CC
```

```
toma0ccag<-conteos[c(21:30,101:120,181:190), 4]
```

```
toma0ccre<-conteos[c(31:40,61:80,121:130,221:250,271:280,301:320,341:350), 4]
```

```
toma1ccag<-conteos[c(1:20,41:60,131:170,191:210), 4]
```

```
toma1ccre<-conteos[c(211:220,251:270,281:300,321:330), 4]
```

```
toma2ccag<-conteos[c(171:180), 4]
```

```
toma2ccre<-conteos[c(331:340), 4]
```

```
mean(toma0ccag)
```

```
mean(toma0ccre)
```

```
mean(toma1ccag)
```

```
mean(toma1ccre)
```

```
mean(toma2ccag)
```

```
mean(toma2ccre)
```

```
sampletoma0ccre<-sample(toma0ccre,40, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```

toma0cc<-data.frame(sampletoma0ccre,toma0ccag)
xtoma0cc<-chisq.test(toma0cc, correct=FALSE)
phixtoma0cc<-sqrt(xtoma0cc$statistic/40)

sampletoma1ccag<-sample(toma1ccag,60, replace=FALSE, prob=NULL)
toma1cc<-data.frame(sampletoma1ccag,toma1ccre)
xtoma1cc<-chisq.test(toma1cc, correct=FALSE)
phixtoma1cc<-sqrt(xtoma1cc$statistic/60)

toma2cc<-data.frame(toma2ccre,toma2ccag)
xtoma2cc<-chisq.test(toma2cc, correct=FALSE)
phixtoma2cc<-sqrt(xtoma2cc$statistic/10)

#KR
toma0krag<-conteos[c(21:30,101:120,181:190), 5]
toma0krre<-conteos[c(31:40,61:80,121:130,221:250,271:280,301:320,341:350), 5]
toma1krag<-conteos[c(1:20,41:60,131:170,191:210), 5]
toma1krre<-conteos[c(211:220,251:270,281:300,321:330), 5]
toma2krag<-conteos[c(171:180), 5]
toma2krre<-conteos[c(331:340), 5]
mean(toma0krag)
mean(toma0krre)
mean(toma1krag)

```

```
mean(toma1krre)
```

```
mean(toma2krag)
```

```
mean(toma2krre)
```

```
sampletoma0krre<-sample(toma0krre,40, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
toma0kr<-data.frame(sampletoma0krre,toma0krag)
```

```
xtoma0kr<-chisq.test(toma0kr, correct=FALSE)
```

```
phixtoma0kr<-sqrt(xtoma0kr$statistic/40)
```

```
sampletoma1krag<-sample(toma1krag,60, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
toma1kr<-data.frame(sampletoma1krag,toma1krre)
```

```
xtoma1kr<-chisq.test(toma1kr, correct=FALSE)
```

```
phixtoma1kr<-sqrt(xtoma1kr$statistic/60)
```

```
toma2kr<-data.frame(toma2krre,toma2krag)
```

```
xtoma2kr<-chisq.test(toma2kr, correct=FALSE)
```

```
phixtoma2kr<-sqrt(xtoma2kr$statistic/10)
```

```
#BN
```

```
toma0bnag<-conteos[c(21:30,101:120,181:190), 6]
```

```
toma0bnre<-conteos[c(31:40,61:80,121:130,221:250,271:280,301:320,341:350), 6]
```

```
toma1bnag<-conteos[c(1:20,41:60,131:170,191:210), 6]
```

```
toma1bnre<-conteos[c(211:220,251:270,281:300,321:330), 6]
```

```
toma2bnag<-conteos[c(171:180), 6]
```

```
toma2bnre<-conteos[c(331:340), 6]
```

```
mean(toma0bnag)
```

```
mean(toma0bnre)
```

```
mean(toma1bnag)
```

```
mean(toma1bnre)
```

```
mean(toma2bnag)
```

```
mean(toma2bnre)
```

```
sampletoma0bnre<-sample(toma0bnre,40, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
toma0bn<-data.frame(sampletoma0bnre,toma0bnag)
```

```
xtoma0bn<-chisq.test(toma0bn, correct=FALSE)
```

```
phixtoma0bn<-sqrt(xtoma0bn$statistic/40)
```

```
sampletoma1bnag<-sample(toma1bnag,60, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
toma1bn<-data.frame(sampletoma1bnag,toma1bnre)
```

```
xtoma1bn<-chisq.test(toma1bn, correct=FALSE)
```

```
phixtoma1bn<-sqrt(xtoma1bn$statistic/60)
```

```
toma2bn<-data.frame(toma2bnre,toma2bnag)
```

```
xtoma2bn<-chisq.test(toma2bn, correct=FALSE)
```

```
phixtoma2bn<-sqrt(xtoma2bn$statistic/10)
```

```

#KL

toma0ktag<-conteos[c(21:30,101:120,181:190), 7]

toma0klre<-conteos[c(31:40,61:80,121:130,221:250,271:280,301:320,341:350), 7]

toma1ktag<-conteos[c(1:20,41:60,131:170,191:210), 7]

toma1klre<-conteos[c(211:220,251:270,281:300,321:330), 7]

toma2ktag<-conteos[c(171:180), 7]

toma2klre<-conteos[c(331:340), 7]

mean(toma0ktag)

mean(toma0klre)

mean(toma1ktag)

mean(toma1klre)

mean(toma2ktag)

mean(toma2klre)

sampletoma0klre<-sample(toma0klre,40, replace=FALSE, prob=NULL)

toma0kl<-data.frame(sampletoma0klre,toma0ktag)

xtoma0kl<-chisq.test(toma0kl, correct=FALSE)

phixtoma0kl<-sqrt(xtoma0kl$statistic/40)

sampletoma1ktag<-sample(toma1ktag,60, replace=FALSE, prob=NULL)

toma1kl<-data.frame(sampletoma1ktag,toma1klre)

xtoma1kl<-chisq.test(toma1kl, correct=FALSE)

phixtoma1kl<-sqrt(xtoma1kl$statistic/60)

```

```

toma2kl<-data.frame(toma2klre,toma2klag)
xtoma2kl<-chisq.test(toma2kl, correct=FALSE)
phixtoma2kl<-sqrt(xtoma2kl$statistic/10)

#PY
toma0pyag<-conteos[c(21:30,101:120,181:190), 8]
toma0pyre<-conteos[c(31:40,61:80,121:130,221:250,271:280,301:320,341:350), 8]
toma1pyag<-conteos[c(1:20,41:60,131:170,191:210), 8]
toma1pyre<-conteos[c(211:220,251:270,281:300,321:330), 8]
toma2pyag<-conteos[c(171:180), 8]
toma2pyre<-conteos[c(331:340), 8]
mean(toma0pyag)
mean(toma0pyre)
mean(toma1pyag)
mean(toma1pyre)
mean(toma2pyag)
mean(toma2pyre)

sampletoma0pyre<-sample(toma0pyre,40, replace=FALSE, prob=NULL)
toma0py<-data.frame(sampletoma0pyre,toma0pyag)
xtoma0py<-chisq.test(toma0py, correct=FALSE)
phixtoma0py<-sqrt(xtoma0py$statistic/40)

```

```
sampletoma1pyag<-sample(toma1pyag,60, replace=FALSE, prob=NULL)
```

```
toma1py<-data.frame(sampletoma1pyag,toma1pyre)
```

```
xtoma1py<-chisq.test(toma1py, correct=FALSE)
```

```
phixtoma1py<-sqrt(xtoma1py$statistic/60)
```

```
toma2py<-data.frame(toma2pyre,toma2pyag)
```

```
xtoma2py<-chisq.test(toma2py, correct=FALSE)
```

```
phixtoma2py<-sqrt(xtoma2py$statistic/10)
```